

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6012603号
(P6012603)

(45) 発行日 平成28年10月25日 (2016. 10. 25)

(24) 登録日 平成28年9月30日 (2016. 9. 30)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 K	38/00	(2006. 01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K	45/00	(2006. 01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K	39/39	(2006. 01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 P	31/00	(2006. 01)	A 6 1 P 31/00
A 6 1 P	1/02	(2006. 01)	A 6 1 P 1/02

請求項の数 13 (全 39 頁)

(21) 出願番号	特願2013-528356 (P2013-528356)	(73) 特許権者	510090748
(86) (22) 出願日	平成23年9月9日 (2011. 9. 9)		ユニバーシティー オブ サザン カリフォルニア
(65) 公表番号	特表2013-542185 (P2013-542185A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 900
(43) 公表日	平成25年11月21日 (2013. 11. 21)		15, ロサンゼルス, サウス オリーブ
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/051107		ストリート 1150, スイート
(87) 国際公開番号	W02012/034090		2300, ユーエスシー スティーブンス
(87) 国際公開日	平成24年3月15日 (2012. 3. 15)		インスティテュート フォー イノベーション
審査請求日	平成26年8月8日 (2014. 8. 8)	(73) 特許権者	502200830
(31) 優先権主張番号	61/381, 377		ネイションワイド チルドレンズ ホスピタル,
(32) 優先日	平成22年9月9日 (2010. 9. 9)		インコーポレイテッド
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 オハイオ 43205,
前置審査			コロバス, チルドレンズ ドライブ
			700
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオフィルムを除去するための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験体における微生物バイオフィルムを阻害する、予防する、破壊するまたは処置するための方法において使用するための、HMGボックスドメインを含むポリペプチドを含む組成物であって、該ポリペプチドは、以下：

高移動度ボックス2タンパク質(HMGB2)、高移動度ボックス3タンパク質(HMGB3)、高移動度ボックス4タンパク質(HMGB4)、クロマチンSRY(性別決定領域Yタンパク質)の非ヒストン性成分、転写因子のSOXファミリー、配列特異的LEF1(リンパ系エンハンサー結合因子1)、TCF-1(T細胞因子1)、転写および複製に関する構造特異的認識タンパク質SSRP; MTF1ミトコンドリア転写因子、RNAポリメラーゼIによる転写に関する核小体転写因子UBF1/2(上流結合因子)、Abf2酵母ARS結合因子、Ixr1、Rox1、Nhp6bおよびSpp41の群より選択される酵母転写因子；真菌の有性生殖に関する接合型タンパク質(MAT)、YABBY植物特異的転写因子の群より選択されるポリペプチドの高移動度ボックスドメインを含むポリペプチド、または

高移動度ボックス2タンパク質(HMGB2)、高移動度ボックス3タンパク質(HMGB3)、高移動度ボックス4タンパク質(HMGB4)、クロマチンSRY(性別決定領域Yタンパク質)の非ヒストン性成分、転写因子のSOXファミリー、配列特異的LEF1(リンパ系エンハンサー結合因子1)、TCF-1(T細胞因子1)、転写および複製に関する構造特異的認識タンパク質SSRP; MTF1ミトコンドリア転写因子、R

NAポリメラーゼIによる転写に關与する核小体転写因子UBF1/2(上流結合因子)、Abf2酵母ARS結合因子、Ixr1、Rox1、Nhp6bおよびSpp41の群より選択される酵母転写因子；真菌の有性生殖に關与する接合型タンパク質(MAT)、YABBY植物特異的転写因子の群より選択されるポリペプチドのHMGボックスドメインに対して少なくとも90%同一であるHMGボックスドメインを含むポリペプチド、

であり、
ここで、該ポリペプチドは、デオキシリボ核酸BII(DNABII)ポリペプチドまたはタンパク質と微生物DNAとの結合を阻害する、競合する、または低減する、組成物。

【請求項2】

前記ポリペプチドが、前記被験体における前記微生物バイオフィルムのDNA/タンパク質マトリックス構成成分の形成を減少させる、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記ポリペプチドが、翻訳後修飾されたもしくは翻訳後修飾されていない哺乳動物タンパク質、翻訳後にアルキル化されたもしくは翻訳後にアルキル化されていない哺乳動物のタンパク質、または非哺乳動物系において発現されたタンパク質の群から選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

前記タンパク質がヒトタンパク質である、請求項3に記載の組成物。

【請求項5】

前記ポリペプチドが、有効量の、抗菌物質、抗原性ペプチド、またはアジュバントのうちの1つまたは複数と組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項1から4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項6】

前記被験体が、小児科の患者であり、前記ポリペプチドが、該小児科の患者用の処方物で投与される、請求項1から5のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項7】

前記バイオフィルムが、*S. sobrinus*、*S. pyogenes*、*S. gordonii* Challis、*S. agalactiae*、*S. mutans*、*S. pneumoniae*、*S. gallolyticus*、*S. aureus*、*S. epidermidis*、*E. coli*、*H. influenza*、*Salmonella enteric serovar typhi*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、YP 003255304、*P. gingivalis*、*N. gonorrhoeae*、*N. meningitides*、NMB 1302、*P. aeruginosa*、*H. pylori*、*B. burgdorferi*、*Moraxella catarrhalis*、*V. cholera* El Tor、*Burkholderia cenocepacia*、*Burkholderia pseudomallei*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Mycobacterium smegmatis*、*Treponema denticola*、*Treponema palladium* Nichols、*Prevotella melaninogenica*、*Prevotella intermedia*、*Bordetella pertussis* Tohama、および、*Enterococcus faecalis*から選択される微生物由来の微生物DNAを含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項8】

前記ポリペプチドが、局所的に、経皮的に、舌下に、直腸に、膺に、眼に、皮下に、筋肉内に、腹腔内に、尿道に、鼻腔内に、吸入によって、または経口的に、を含む方法によって投与される、請求項1から7のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項9】

被験体における微生物バイオフィルムを阻害する、予防するまたは処置するための方法

10

20

30

40

50

における使用のためのキットであって、該キットは、請求項 1 に記載の任意の 1 種または複数のポリペプチドと、バイオフィルムを破壊する、またはバイオフィルムを生じる微生物感染を阻害する、予防する、もしくは処置するのに使用するための指示書とを含む、キット。

【請求項 10】

アジュバント、抗原性ペプチド、または抗菌物質のうちの 1 種または複数をさらに含む、請求項 9 に記載の使用のためのキット。

【請求項 11】

インビトロにおける微生物バイオフィルムを阻害する、予防するまたは処置するための方法における使用のためのキットであって、該キットは、請求項 1 に記載の任意の 1 種または複数のポリペプチドと、バイオフィルムを破壊する、またはバイオフィルムを生じる微生物感染を阻害する、予防する、もしくは処置するのに使用するための指示書とを含む、キット。

10

【請求項 12】

微生物バイオフィルムを阻害する、予防する、破壊するまたは処置するためのインビトロでの方法における、HMGボックスドメインを含むポリペプチドの使用であって、該ポリペプチドは、インビトロで該バイオフィルムと接触させられ、ここで、該ポリペプチドは、以下：

高移動度ボックス 2 タンパク質 (HMG B 2)、高移動度ボックス 3 タンパク質 (HMG B 3)、高移動度ボックス 4 タンパク質 (HMG B 4)、クロマチン S R Y (性別決定領域 Y タンパク質) の非ヒストン性成分、転写因子の S O X ファミリー、配列特異的 L E F 1 (リンパ系エンハンサー結合因子 1)、T C F - 1 (T 細胞因子 1)、転写および複製に關与する構造特異的認識タンパク質 S S R P ; M T F 1 ミトコンドリア転写因子、R N A ポリメラーゼ I による転写に關与する核小体転写因子 U B F 1 / 2 (上流結合因子)、A b f 2 酵母 A R S 結合因子、l x r 1、R o x 1、N h p 6 b および S p p 4 1 の群より選択される酵母転写因子；真菌の有性生殖に關与する接合型タンパク質 (M A T)、Y A B B Y 植物特異的転写因子の群より選択されるポリペプチドの高移動度ボックスドメインを含むポリペプチド、または

20

高移動度ボックス 2 タンパク質 (HMG B 2)、高移動度ボックス 3 タンパク質 (HMG B 3)、高移動度ボックス 4 タンパク質 (HMG B 4)、クロマチン S R Y (性別決定領域 Y タンパク質) の非ヒストン性成分、転写因子の S O X ファミリー、配列特異的 L E F 1 (リンパ系エンハンサー結合因子 1)、T C F - 1 (T 細胞因子 1)、転写および複製に關与する構造特異的認識タンパク質 S S R P ; M T F 1 ミトコンドリア転写因子、R N A ポリメラーゼ I による転写に關与する核小体転写因子 U B F 1 / 2 (上流結合因子)、A b f 2 酵母 A R S 結合因子、l x r 1、R o x 1、N h p 6 b および S p p 4 1 の群より選択される酵母転写因子；真菌の有性生殖に關与する接合型タンパク質 (M A T)、Y A B B Y 植物特異的転写因子の群より選択されるポリペプチドの H M G ボックスドメインに対して少なくとも 9 0 % 同一である H M G ボックスドメインを含むポリペプチド、であり、

30

ここで、該ポリペプチドは、デオキシリボ核酸 B I I (D N A B I I) ポリペプチドまたはタンパク質と微生物 D N A との結合を阻害する、競合する、または低減する、使用。

40

【請求項 13】

微生物バイオフィルムを阻害する、予防する、破壊するまたは処置するためのインビトロでの方法であって、該方法は、HMGボックスドメインを含むポリペプチドを、インビトロで該バイオフィルムと接触させる工程を包含し、ここで、該ポリペプチドは、以下：

高移動度ボックス 2 タンパク質 (HMG B 2)、高移動度ボックス 3 タンパク質 (HMG B 3)、高移動度ボックス 4 タンパク質 (HMG B 4)、クロマチン S R Y (性別決定領域 Y タンパク質) の非ヒストン性成分、転写因子の S O X ファミリー、配列特異的 L E F 1 (リンパ系エンハンサー結合因子 1)、T C F - 1 (T 細胞因子 1)、転写および複製に關与する構造特異的認識タンパク質 S S R P ; M T F 1 ミトコンドリア転写因子、R

50

NAポリメラーゼIによる転写に關与する核小体転写因子UBF1/2(上流結合因子)、Abf2酵母ARS結合因子、Ixr1、Rox1、Nhp6bおよびSpp41の群より選択される酵母転写因子；真菌の有性生殖に關与する接合型タンパク質(MAT)、YABBY植物特異的転写因子の群より選択されるポリペプチドの高移動度ボックスドメインを含むポリペプチド、または

高移動度ボックス2タンパク質(HMGB2)、高移動度ボックス3タンパク質(HMGB3)、高移動度ボックス4タンパク質(HMGB4)、クロマチンSRY(性別決定領域Yタンパク質)の非ヒストン性成分、転写因子のSOXファミリー、配列特異的LEF1(リンパ系エンハンサー結合因子1)、TCF-1(T細胞因子1)、転写および複製に關与する構造特異的認識タンパク質SSRP；MTF1ミトコンドリア転写因子、RNAポリメラーゼIによる転写に關与する核小体転写因子UBF1/2(上流結合因子)、Abf2酵母ARS結合因子、Ixr1、Rox1、Nhp6bおよびSpp41の群より選択される酵母転写因子；真菌の有性生殖に關与する接合型タンパク質(MAT)、YABBY植物特異的転写因子の群より選択されるポリペプチドのHMGボックスドメインに対して少なくとも90%同一であるHMGボックスドメインを含むポリペプチド、であり、

ここで、該ポリペプチドは、デオキシリボ核酸BII(DNABII)ポリペプチドまたはタンパク質と微生物DNAとの結合を阻害する、競合する、または低減する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、米国特許法§119(e)の下、2010年9月9日に出願された米国仮出願第61/381,377号(この内容は、その全体が本開示に参考として援用される)の利益を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明は概して、臨床上または工業上の細菌性バイオフィルムを減少させるおよび/または治癒するための方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

ヒト体内でバイオフィルム中に存続している細菌は、すべての慢性/再発性の疾患のうちの約3分の2を引き起こす。こうしたバイオフィルムは、先天性および適応免疫系、抗生物質、及び他の抗菌剤が、バイオフィルムの内側の細菌に接近するのを妨げるような、主としてDNAからなることが多い外側の「スライム」によって保護される細菌から構成される。バイオフィルムは、身体から感染症を除去することを非常に困難にする。さらに、バイオフィルムは、しばしば致命的な結果を伴う将来の急性感染症の貯蔵庫として働く可能性がある。

【0004】

DNABIIファミリーのタンパク質由来の少なくとも1種のタンパク質が、すべての既知の真正細菌において見出されており、これらは、細菌細胞の外側に天然に見られる。これらは、強い先天性免疫応答を引き起こすので、宿主被験体は、感染の結果としての、ファミリーメンバーに特異的な抗体を、自然には生じることができない。細菌性バイオフィルムに関する重大な問題は、宿主免疫系および/または抗生物質および他の抗菌物質が、バイオフィルム内に保護された細菌に接近できないことである。

【0005】

バイオフィルムは、工業環境にも存在する。例えば、バイオフィルムは、生産現場から給油所の貯蔵タンクまでの様々な石油処理問題に關与している。生産現場では、硫酸塩還元バイオフィルム細菌が、硫化水素(サワーオイル(sour oil))を産生する。処理パイプラインでは、バイオフィルムの活動によって、フィルター及びオリフィス

10

20

30

40

50

の妨害物となるスライムが発生する。バイオフィームおよびバイオフィーム微生物はまた、パイプライン及び石油処理設備の腐食も引き起こす。これらの問題は、汚損性かつ腐食性のバイオフィーム微生物が、最終製品の貯蔵タンクの表面上にも見出されるところまで、オイルまたはガス生産設備全体を通して顕在化している可能性がある。

【0006】

家庭では、バイオフィームは、例えば、排水管内、食品調理物表面上、トイレ内、ならびに水泳プールおよびスパ内などの、微生物の増殖を助長するような、いかなる表面にも見られる。

【0007】

バイオフィームは、家庭と工業両方の様々な水処理に関与している。バイオフィームは、処理設備の表面上で増殖し、熱伝達の低下や、フィルターおよび膜の詰まりなど、設備の性能を低下させる可能性がある。冷却塔充填材上のバイオフィーム増殖は、充填材を崩壊させるのに十分な重量を与える可能性がある。バイオフィームは、非常に特殊なステンレス鋼でさえ腐食させる。水処理におけるバイオフィームは、最終生成物の価値を低下させる可能性がある。飲料水分配システムにおいて増殖するバイオフィームは、潜在的な病原性微生物、腐食性微生物、または水の美的特性を低下させる細菌を含む可能性がある。

10

【0008】

したがって、バイオフィームの保護バリアを破壊して、関連のある細菌感染症を処置または死滅させること、ならびにこれらを表面および水系内から除去することが必要である。本発明は、この必要性を満たし、関連する利点も提供する。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本明細書では、HMGB1などの、1つまたは複数のHMGBボックスドメインを有するポリペプチドが、バイオフィームの内側の細胞外DNA骨格の構造に支障を与えることができることが発見された。こうしたポリペプチドは、バイオフィーム内のDNA骨格と結合する微生物タンパク質と競合することによって、バイオフィームを不安定化し、宿主免疫系によるバイオフィームの破壊および除去をもたらす。

【0010】

HMGBボックスドメイン(1つまたは複数)は、タンパク質が、キックしたまたは巻き戻されたDNA構造などの非B型DNA構造と結合できるようにする。HMGB1、HMGB2、HMGB3、およびHMGB4などの、HMGBボックスドメインを含有するタンパク質は、重要な細胞内機能を果たす。例えば、HMGB1は、「あらかじめ湾曲」であるDNA構造と結合し、多くの種類のDNA代謝、例えば、RAG1/2介在性の免疫グロブリン組み換えにおいて機能すると考えられている。さらに、HMGB1タンパク質は、細胞外に見出され、先天性免疫系の一部としてアポトーシス細胞ではなくネクローシス細胞によって放出されることが知られている。本明細書では、HMGB1が、細菌性バイオフィーム群集に添加された場合に、バイオフィームにおけるDNAを基礎とする格子を変化させることが認められた。次いで、このようなDNAを基礎とする格子の変化により、宿主免疫系がバイオフィームに接近できるようになり、宿主免疫系がバイオフィームを除去することが可能になる。

30

40

【0011】

この技術を使用するための方法を、本明細書で提供する。細菌性バイオフィームの細胞外DNA被覆物を不安定化するための治療薬として、HMGBボックスドメインを含有するポリペプチドを使用することができる。機能するバイオフィームを形成できない細菌は、残りの宿主免疫系によって、より容易に除去される。

【0012】

したがって、本開示の一実施形態は、DNABIIポリペプチドまたはタンパク質と微生物DNAとの結合を阻害する、競合する、または低減(titrating)するための方法であって、DNABIIポリペプチドもしくはタンパク質または微生物DNAを、

50

HMGボックスドメインを含むポリペプチドと接触させ、それによって、DNA B I I タンパク質またはポリペプチドと微生物DNAとの結合を阻害する、競合する、または低減する工程を含む方法を提供する。

【0013】

本開示の別の実施形態は、微生物バイオフィルムを阻害する、予防する、または破壊するための方法であって、該バイオフィルムを、HMGボックスドメインを含むポリペプチドと接触させ、それによって、微生物バイオフィルムを阻害する、予防する、または破壊する工程を含む方法を提供する。いくつかの実施態様では、接触は、*in vitro*または*in vivo*である。

【0014】

本開示のさらに別の実施形態は、被験体においてバイオフィルムを阻害する、予防する、または破壊する方法であって、HMGボックスドメインを含む有効量のポリペプチドを被験体に投与し、それによって、微生物バイオフィルムを阻害する、予防する、または破壊する工程を含む方法を提供する。

【0015】

別の実施形態では、被験体においてバイオフィルムを生じる微生物感染を阻害する、予防する、または処置するための方法であって、HMGボックスドメインを含む有効量のポリペプチドを被験体に投与し、それによって、被験体においてバイオフィルムを生じる微生物感染を阻害する、予防する、または処置する工程を含む方法も提供される。

【0016】

上の実施形態のいずれかの一実施態様では、HMGボックスドメインを含むポリペプチドは、以下のうちの1つまたは複数を含む：

(a) 1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMG B 1またはそのフラグメント；

(b) 1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMG B 2またはそのフラグメント；

(c) 1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMG B 3またはそのフラグメント；

(d) 1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMG B 4またはそのフラグメント；または

(e) (a)、(b)、(c)、または(d)のいずれかと少なくとも約70%同一であるポリペプチド。

【0017】

別の実施態様では、HMGボックスドメインを含むポリペプチドは、1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMG B 1、HMG B 1と少なくとも約70%同一であるポリペプチド、またはそれらのフラグメントを含む。

【0018】

いくつかの実施態様では、単離されたまたは組み換え型のタンパク質は、哺乳動物タンパク質である。特定の実施態様では、哺乳動物タンパク質は、ヒトタンパク質である。

【0019】

上の方法のいずれかは、有効量の1種または複数の抗菌物質、抗原性ペプチド、またはアジュバントを被験体に投与することをさらに含むことができる。被験体は、一実施態様では、非ヒト動物またはヒト患者である。

【0020】

ポリペプチドは、局所的に、経皮的に、舌下に、直腸に、膺に、眼に、皮下に、筋肉内に、腹腔内に、尿道に、鼻腔内に、吸入によって、または経口的に、を含む方法によって投与される。

【0021】

いくつかの実施態様では、被験体は、小児科の患者であり、ポリペプチドは、小児科の

10

20

30

40

50

患者用の処方物で投与される。

【 0 0 2 2 】

上の実施形態のいずれかでは、バイオフィルムは、表 1 に特定される微生物由来の微生物 DNA を含む可能性がある。

【 0 0 2 3 】

【表 1】

表1. バイオフィルムを産生する可能性がある細菌株の例

<i>S. sobrinus</i>	
<i>S. pyogenes</i>	
<i>S. gordonii</i> Challis	
<i>S. agalactiae</i>	
<i>S. mutans</i>	10
<i>S. pneumoniae</i>	
<i>S. gallolyticus</i>	
<i>S. aureus</i>	
<i>S. epidermidis</i>	
<i>E. coli</i>	
<i>H. influenza</i>	
<i>Salmonella enteric serovar typhi</i>	20
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> YP_003255304	
<i>P. gingivalis</i>	
<i>N. gonorrhoeae</i>	
<i>N. meningitidis</i> NMB_1302	
<i>P. aeruginosa</i>	30
<i>H. pylori</i>	
<i>B. burgdorferi</i>	
<i>Moraxella catarrhalis</i>	
<i>V. cholera</i> El Tor	
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	40
<i>Treponema denticola</i>	
<i>Treponema palladium</i> Nichols	
<i>Prevotella melaninogenica</i>	
<i>Prevotella intermedia</i>	
<i>Bordetella pertusis</i> Tohama	
<i>Enterococcus faecalis</i>	

－実施形態では、ポリペプチドは、微生物感染に対して局所的に投与される。

【 0 0 2 5 】

－実施形態では、本開示は、免疫応答の誘発または提供を必要とする被験体において免疫応答を誘発するまたは提供するための方法であって、HMGボックスドメインを含む有効量のポリペプチドを被験体に投与する工程を含む方法を提供する。別の実施形態では、投与は、免疫応答が所望される場所に限局的なものである (local to)。

【 0 0 2 6 】

－実施態様では、HMGボックスドメインを含むポリペプチドは、以下のうちの1つまたは複数を含む：

(a) 1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMG B 1またはそのフラグメント；

(b) 1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMG B 2またはそのフラグメント；

(c) 1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMG B 3またはそのフラグメント；

(d) 1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMG B 4またはそのフラグメント；または

(e) (a)、(b)、(c)、または(d)のいずれかと少なくとも約70%同一であるポリペプチド。

【 0 0 2 7 】

特定の実施態様では、HMGボックスドメインを含むポリペプチドは、1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMG B 1、HMG B 1と少なくとも約70%同一であるポリペプチド、またはそれらのフラグメントを含む。

【 0 0 2 8 】

単離されたまたは組み換え型のタンパク質は、哺乳動物タンパク質、または特定の実施態様ではヒトタンパク質であり得る。被験体は、いくつかの実施態様では、非ヒト動物またはヒト患者である。

【 0 0 2 9 】

バイオフィルムを破壊する、またはバイオフィルムを生じる微生物感染を阻害する、予防する、または処置するのに使用するための、

(a) 1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMG B 1またはそのフラグメント；

(b) 1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMG B 2またはそのフラグメント；

(c) 1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMG B 3またはそのフラグメント；

(d) 1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMG B 4またはそのフラグメント；または

(e) (a)、(b)、(c)、または(d)のいずれかと少なくとも約70%同一であるポリペプチド

の群の任意の1種または複数の薬剤と、使用指示書とを含むキットも提供される。－実施形態では、このキットは、1種または複数のアジュバント、抗原性ペプチド、または抗菌物質をさらに含む。さらに別の実施形態では、このキットは、液体担体、薬学的に受容可能な担体、固相担体、薬学的に受容可能な担体、インプラント、ステント、ペースト、ゲル、歯科用インプラント、または医療用インプラントの群から選択される担体をさらに含む。

【 0 0 3 0 】

本開示のさらに別の実施形態は、バイオフィルムを破壊する、またはバイオフィルムを生じる微生物感染を阻害する、予防する、または処置するための医薬品の製造における、

10

20

30

40

50

以下の群のポリペプチドの使用を提供する：

- (a) 1つまたは複数のH M Gボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質H M G B 1またはそのフラグメント；
- (b) 1つまたは複数のH M Gボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質H M G B 2またはそのフラグメント；
- (c) 1つまたは複数のH M Gボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質H M G B 3またはそのフラグメント；
- (d) 1つまたは複数のH M Gボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質H M G B 4またはそのフラグメント；または
- (e) (a)、(b)、(c)、または(d)のいずれかと少なくとも約70%同一であるポリペプチド。

10

たとえば、本発明は、以下の項目を提供する：

(項目1)

D N A B I Iポリペプチドまたはタンパク質と微生物D N Aとの結合を阻害する、競合する、または低減するための方法であって、該D N A B I Iポリペプチドもしくはタンパク質または該微生物D N Aを、H M Gボックスドメインを含むポリペプチドと接触させ、それによって、該D N A B I Iタンパク質またはポリペプチドと該微生物D N Aとの結合を阻害する、競合する、または低減する工程を含む、方法。

(項目2)

微生物バイオフィルムを阻害する、予防する、または破壊するための方法であって、該バイオフィルムを、H M Gボックスドメインを含むポリペプチドと接触させ、それによって、該微生物バイオフィルムを阻害する、予防する、または破壊する工程を含む、方法。

20

(項目3)

上記接触させる工程が、i n v i t r oまたはi n v i v oにおけるものである、項目1または2に記載の方法。

(項目4)

被験体においてバイオフィルムを阻害する、予防する、または破壊する方法であって、H M Gボックスドメインを含む有効量のポリペプチドを該被験体に投与し、それによって、微生物バイオフィルムを阻害する、予防する、または破壊する工程を含む、方法。

(項目5)

被験体においてバイオフィルムを生じる微生物感染を阻害する、予防する、または処置するための方法であって、H M Gボックスドメインを含む有効量のポリペプチドを該被験体に投与し、それによって、該被験体において該バイオフィルムを生じる微生物感染を阻害する、予防する、または処置する工程を含む、方法。

30

(項目6)

上記H M Gボックスドメインを含むポリペプチドが、

- (a) 1つまたは複数のH M Gボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質H M G B 1またはそのフラグメント；
- (b) 1つまたは複数のH M Gボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質H M G B 2またはそのフラグメント；
- (c) 1つまたは複数のH M Gボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質H M G B 3またはそのフラグメント；
- (d) 1つまたは複数のH M Gボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質H M G B 4またはそのフラグメント；または
- (e) (a)、(b)、(c)、または(d)のいずれかと少なくとも約70%同一であるポリペプチド

40

のうちの1つまたは複数を含む、項目1から5のいずれか一項に記載の方法。

(項目7)

上記H M Gボックスドメインを含むポリペプチドが、1つまたは複数のH M Gボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質H M G B 1、H M G B 1と少

50

なくとも約70%同一であるポリペプチド、またはそれらのフラグメントを含む、項目1から6のいずれか一項に記載の方法。

(項目8)

上記単離されたまたは組み換え型のタンパク質が、翻訳後修飾されたもしくは翻訳後修飾されていない哺乳動物タンパク質、翻訳後にアルキル化されたもしくは翻訳後にアルキル化されていない哺乳動物のタンパク質、または非哺乳動物系において発現されたタンパク質の群から選択される、項目6または7に記載の方法。

(項目9)

上記哺乳動物タンパク質が、ヒトタンパク質である、項目8に記載の方法。

(項目10)

有効量の、抗菌物質、抗原性ペプチド、またはアジュバントのうちの1つまたは複数を上記被験体に投与する工程をさらに含む、項目4から9のいずれか一項に記載の方法。

(項目11)

上記被験体が、非ヒト動物またはヒト患者である、項目4から10のいずれか一項に記載の方法。

(項目12)

上記ポリペプチドが、局所的に、経皮的に、舌下に、直腸に、膺に、眼に、皮下に、筋肉内に、腹腔内に、尿道に、鼻腔内に、吸入によって、または経口的に、を含む方法によって投与される、項目4から11のいずれか一項に記載の方法。

(項目13)

上記被験体が、小児科の患者であり、上記ポリペプチドが、該小児科の患者用の処方物で投与される、項目4から12のいずれか一項に記載の方法。

(項目14)

上記バイオフィルムが、表1に特定される微生物由来の微生物DNAを含む、項目4から13のいずれか一項に記載の方法。

(項目15)

上記ポリペプチドが、上記微生物感染に対して局所的に投与される、項目4から14のいずれか一項に記載の方法。

(項目16)

免疫応答の誘発または提供を必要とする被験体において免疫応答を誘発するまたは提供するための方法であって、HMGボックスドメインを含む有効量のポリペプチドを該被験体に投与する工程を含む、方法。

(項目17)

上記投与が、上記免疫応答が所望される場所に限局的なものである、項目16に記載の方法。

(項目18)

上記HMGボックスドメインを含むポリペプチドが、
(a) 1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMG B 1またはそのフラグメント；

(b) 1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMG B 2またはそのフラグメント；

(c) 1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMG B 3またはそのフラグメント；

(d) 1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMG B 4またはそのフラグメント；または

(e) (a)、(b)、(c)、または(d)のいずれかと少なくとも約70%同一であるポリペプチド

のうちの1つまたは複数を含む：項目16または17に記載の方法。

(項目19)

上記HMGボックスドメインを含むポリペプチドが、1つまたは複数のHMGボックス

10

20

30

40

50

ドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質H M G B 1、H M G B 1と少なくとも約70%同一であるポリペプチド、またはそれらのフラグメントを含む、項目16から18のいずれか一項に記載の方法。

(項目20)

上記単離されたまたは組み換え型のタンパク質が、哺乳動物タンパク質である、項目18または19に記載の方法。

(項目21)

上記哺乳動物タンパク質が、ヒトタンパク質である、項目20に記載の方法。

(項目22)

上記被験体が、非ヒト動物またはヒト患者である、項目16から21のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目23)

バイオフィルムを破壊する、またはバイオフィルムを生じる微生物感染を阻害する、予防する、または処置するのに使用するための、

(a) 1つまたは複数のH M Gボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質H M G B 1またはそのフラグメント；

(b) 1つまたは複数のH M Gボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質H M G B 2またはそのフラグメント；

(c) 1つまたは複数のH M Gボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質H M G B 3またはそのフラグメント；

20

(d) 1つまたは複数のH M Gボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質H M G B 4またはそのフラグメント；または

(e) (a)、(b)、(c)、または(d)のいずれかと少なくとも約70%同一であるポリペプチド

の群の任意の1種または複数のポリペプチドと、指示書とを含む、キット

(項目24)

アジュバント、抗原性ペプチド、または抗菌物質のうちの1種または複数をさらに含む、項目23に記載のキット。

(項目25)

液体担体、薬学的に受容可能な担体、固相担体、薬学的に受容可能な担体、インプラント、ステント、ペースト、ゲル、歯科用インプラント、または医療用インプラントの群から選択される担体をさらに含む、項目23または24に記載のキット。

30

(項目26)

バイオフィルムを破壊する、またはバイオフィルムを生じる微生物感染を阻害する、予防する、または処置するための医薬品の製造における、

(a) 1つまたは複数のH M Gボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質H M G B 1またはそのフラグメント；

(b) 1つまたは複数のH M Gボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質H M G B 2またはそのフラグメント；

(c) 1つまたは複数のH M Gボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質H M G B 3またはそのフラグメント；

40

(d) 1つまたは複数のH M Gボックスドメインを含む、単離されたまたは組み換え型のタンパク質H M G B 4またはそのフラグメント；または

(e) (a)、(b)、(c)、または(d)のいずれかと少なくとも約70%同一であるポリペプチド

の群のポリペプチドの使用。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】図1は、認識されたタンパク質を示す、それぞれ異なる抗体を用いるウェスタン

50

プロットゲル写真である。HMGB1に対するポリクローナル抗血清は、DNABIITアンパク質メンバーとは交差反応せず、DNABIITに対するポリクローナル抗血清ファミリーメンバーは、HMGB1とは交差反応しない。

【図2】図2は、ヤギ抗ヒトHMGB1抗体の結合特異性と、HMGB1が未処理血清中に見られることとを示すウェスタンプロットゲル写真である。

【図3】図3は、24時間時点で抗HMGB1抗体で処理していない(左)または処理した(右)40hインビトロNTHIバイオフィルムの共焦点顕微鏡観察の画像を示す。この画像では、抗体による、未処理血清中に見られるHMGB1の減少が、より薄い左下のバイオフィルムに比べて、より厚い右下のバイオフィルムとして示される、バイオフィルム増殖の増進を引き起こすことが示される。

10

【図4】図4は、ウェスタンプロットによる、哺乳動物の未処理血清におけるHMGB1の検出を示すゲル画像を含む。矢印は、各サンプル中に検出されたHMGB1を示す。HMGB1が、Hisタグを有していたことに留意されたい。HMGB1レーンに見られる二重線はまた、仕様書の例示プロットに存在していた。

【図5】図5は、異なる濃度のHMGB1で処理されたNTHIバイオフィルムの共焦点顕微鏡観察画像を示し、HMGB1が、バイオフィルム形成を用量依存的に阻害することが示される。対照：滅菌培地sBHI(2mgヘム/mLと2mg b-NAD/mLを含むBHI)中。

【図6】図6は、ヒト気管支肺胞洗浄液(BAL)中のHMGB1およびIHFの二重標識画像を示す：A、Alexafluor 488が結合された抗体を用いるHMGB1の標識；B、Alexafluor 594が結合された抗体を用いるIHFの標識；C、両方の抗体の所在を示す、(A)と(B)の組み合わせ画像。すべての画像において、DAPIは、白色に疑似カラー処理された。

20

【図7】図7は、中耳のチンチラにおけるNTHIによって形成されたバイオマスのHMGB1およびIHF標識を示す顕微鏡観察画像を示す。この画像は、ヤギ抗HMGB1(1:25希釈)とウサギ抗IHF(1:200希釈)を使用して、HMGB1とIHFについて同時標識した、バイオマスを埋め込んだOCTの連続部分からのものである。標識は、ロバ抗ヤギAlexaFluor 488とロバ抗ウサギAlexaFluor 594を使用して検出した。dsDNAを、DAPIで染色し、白色に疑似カラー処理した。

30

【図8】図8は、HMGB1が、dsDNA鎖の長さに沿って一定間隔で検出されたことを示す。ジャンクションでIHFと近接していることも判明した。

【図9】図9は、スライドの同じ部分の異なるz平面画像を示す。HMGB1とIHFは、dsDNAの鎖のジャンクションで両方とも検出され、これらは近接している。

【図10】図10は、合成のDNA Holidayジャンクションに結合されたHMGB1の電気泳動移動度(electromobility)シフト解析を示す。画像は、HMGB1は、温度を上昇させるとHolidayジャンクション構造の完全性を安定化できないことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0032】

40

別段の定義のない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって共通に理解されるのと同じ意味を有する。本発明の実施または試験において、本明細書に記述するのと同様のまたは等価な任意の方法および材料を使用することができるが、好ましい方法、器具、および材料を、今から説明する。本明細書に引用したすべての技術および特許刊行物の内容全体を、参照として本明細書に組み込む。ここでは何も、こうした開示に先行する権利が、優先する発明のせいで、本発明に与えられないという理解であると解釈されるべきではない。

【0033】

本発明の実施は、別段の指示がない限り、当技術分野内である、組織培養、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、および組み換えDNAの従来技術を用いることとな

50

る。例えば、以下を参照のこと：SambrookおよびRussell編(2001)「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第3版；Ausubelら編(2007)「Current Protocols in Molecular Biology」のシリーズ；「Methods in Enzymology」(Academic Press社、N.Y.)のシリーズ；MacPhersonら(1991)「PCR 1: A Practical Approach」(IRL Press at Oxford University Press)；MacPhersonら(1995)「PCR 2: A Practical Approach」；HarlowおよびLane編(1999)「Antibodies, A Laboratory Manual」；Freshney(2005)「Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique」第5版；Gait編(1984)「Oligonucleotide Synthesis」；米国特許第4,683,195号；HamesおよびHiggins編(1984)「Nucleic Acid Hybridization」；Anderson(1999)「Nucleic Acid Hybridization」；HamesおよびHiggins編(1984)「Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes」(IRL Press (1986))；Perbal(1984)「A Practical Guide to Molecular Cloning」；MillerおよびCalos編(1987)「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」(Cold Spring Harbor Laboratory)；Makrides編(2003)「Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells」；MayerおよびWalker編(1987)「Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology」(Academic Press, London)；およびHerzenbergら編(1996)「Weir's Handbook of Experimental Immunology」。

【0034】

すべての数値記号、例えば、pH、温度、時間、濃度、および分子量は、範囲を含めて、近似値であり、(+)または(-)1.0または0.1だけ、あるいは+/-15%、または10%、または5%、または2%だけ、適宜変動する。常に明示されるというわけではないが、すべての数値記号の前には、用語「約」が置かれることを理解するべきである。常に明示されるというわけではないが、本明細書に記述する試薬は、単なる例示であること、その等価物は当分野で知られていることも理解するべきである。

【0035】

明細書および特許請求の範囲で使用される場合、文脈によって他に明確に指示されない限り、単数形「a」、「an」、および「the」には、複数の言及が含まれる。例えば、用語「ポリペプチド」には、その混合物を含めた、複数のポリペプチドが含まれる。

【0036】

本明細書で使用される場合、用語「含むこと」は、組成物および方法が、他のものを除外せずに、列挙した要素を含むことを意味するものとする。「本質的に～からなること」は、組成物および方法を定義するために使用される場合、意図される使用のための組み合わせにとっていかなる本質的な重要性ももつ他の要素を除外することを意味するものとする。したがって、本質的に、本発明で定義した通りの要素からなる組成物は、単離および精製方法による微量の混入物質や、リン酸緩衝生理食塩水、保存剤などの薬学的に受容可能な担体を除外しないということになる。「～からなること」は、他の成分の微量よりも多い要素を除外すること、および本発明の組成物を投与するための実質的な方法ステップを意味するものとする。これらのそれぞれの変換用語によって定義される実施形態は、本発明の範囲内である。

【0037】

「バイオフィルム」は、バイオフィルムが分泌および/または放出する、DNAなどのポリマーと共に、有機または無機であり得る構造物の表面に時として付着することができる、微生物の薄層または組織化された群落を意味する。バイオフィルムは、微生物(microbiotic)および抗菌剤に対して非常に耐性がある。バイオフィルムは、歯肉組織、歯、および充填物上に生存し、齲蝕および歯周病(歯周ブランク疾患としても知られている)を引き起こす。バイオフィルムは、慢性の中耳感染も引き起こす。バイオフィルムは、歯科用インプラント、ステント、カテーテル管、およびコンタクトレンズの表面上に生じる可能性もある。バイオフィルムは、ペースメーカー、心臓弁置換、人工関節、および他の外科的インプラント上に増殖する。米国疾病予防管理センター(The Centers for Disease Control)は、院内(病院で感染する)感染症の65%がバイオフィルムによって引き起こされると推定している。真菌バイオフィルムはまた、頻繁に医療器具を汚染する。バイオフィルムは、慢性的な腔感染症を引き起こし、免疫系が損なわれた人では、生命を脅かす全身感染症に至る。バイオフィルムはまた、多数の疾患に関与する。例えば、嚢胞性線維症患者は、しばしば抗生物質耐性バイオフィルムをもたらしシュードモナス感染症に罹患する。

10

【0038】

「DNA BIIポリペプチドまたはタンパク質」は、DNA結合ドメインからなり、したがって、DNAに対する特異的または一般的親和性を有するような、DNA結合タンパク質またはポリペプチドを意味する。一実施態様では、これらは、DNAと副溝(minor groove)で結合する。DNA BIIタンパク質の非限定的な例は、組込宿主因子(IHF)タンパク質、および大腸菌株U93由来のヒストン様タンパク質(HU)である。バイオフィルムと結び付くことができる他のDNA結合タンパク質としては、DPS(Genbank Accession No.:CAA49169)、H-NS(Genbank Accession No.:CAA47740)、Hfq(Genbank Accession No.:ACE63256)、CbpA(Genbank Accession No.:BAA03950)、およびCbpB(Genbank Accession No.:NP_418813)が挙げられる。

20

【0039】

「組込宿主因子」または「IHF」タンパク質は、そのDNAを宿主細菌に組み込むためにバクテリオファージによって使用される細菌性タンパク質である。これらは、遺伝的組み換えにおいて、また、転写および翻訳調節において機能する、DNA結合タンパク質である。これらはまた、細胞外の微生物DNAとも結合する。大腸菌におけるIHFタンパク質サブユニットをコードする遺伝子は、himA(Genbank accession No.:POA6X7.1)およびhimD(POA6Y1.1)遺伝子である。これらの遺伝子に対する相同体は、他の微生物において見られ、他の微生物由来のこれらの遺伝子に対応するペプチドは、表1に見ることができる。

30

【0040】

「HMGB1」は、DNAの副溝と結合して歪ませることが報告されており、また、妨害剤(interfering agent)の一つの例である、高移動度ボックス(high mobility group box)(HMGB)1タンパク質である。組み換え型または単離されたタンパク質およびポリペプチドは、AtgenGlobal、ProSpecBio、Protein 1、およびAbnovaから市販品として入手できる。

40

【0041】

「HU」または「大腸菌株U93由来のヒストン様タンパク質」は、大腸菌に一般的に伴われる、あるクラスのヘテロ二量体タンパク質を指す。HUタンパク質は、DNAジャンクションと結合することが知られている。関連するタンパク質が、他の微生物から単離されている。大腸菌HUの完全なアミノ酸配列は、Laineら(1980)「Eur. J. Biochem.」103(3):447-481によって報告された。HUタンパク質に対する抗体は、Abcamから市販品として入手できる。

50

【 0 0 4 2 】

「微生物DNA」は、バイオフィルムを生じる微生物由来の一本鎖または二本鎖DNAを意味する。

【 0 0 4 3 】

バイオフィルムを「阻害すること、予防すること、または破壊すること」は、バイオフィルムの構造の予防的または治療的減少を意味する。一実施態様では、用語「阻害すること、競合すること、または低減すること」は、微生物バイオフィルムの構成成分であるDNA/タンパク質マトリックス（例えば図1に示される通り）の形成の減少を意味する。

【 0 0 4 4 】

「湾曲ポリヌクレオチド」は、他方の鎖とは対合しない一方の鎖上に小さなループを含有する二本鎖ポリヌクレオチド、ならびに、端から端までの距離が、自然な温度変動を超えて減少している、すなわち自然状態のB型二本鎖DNAについて150bpの持続長を超えて湾曲しているようないかなるポリヌクレオチドも意味する。いくつかの実施形態では、ループは、1塩基～約20塩基長、または2塩基～約15塩基長、または約3塩基～約12塩基長、または約4塩基～約10塩基長である、あるいは約4、5、または6、または7、または8、または9、または10塩基を有する。

10

【 0 0 4 5 】

診断または処置の「被験体」は、細胞、または哺乳動物もしくはヒトなどの動物である。診断または処置を受ける非ヒト動物は、感染を受ける動物、あるいは、動物モデル、例えば、サル、ネズミ（ラットなど）、マウス、チンチラ、イヌ科の動物（イヌなど）、ウサギ科の動物（ウサギなど）、家畜、狩猟動物、および愛玩動物である。

20

【 0 0 4 6 】

用語「タンパク質」、「ペプチド」、および「ポリペプチド」は、互換的に使用され、最も広い意味では、2つ以上のサブユニットアミノ酸、アミノ酸類似体、またはペプチドミメティクスの化合物を指す。サブユニットは、ペプチド結合によって連結され得る。別の実施形態では、サブユニットは、他の結合、エステル、エーテルなどによって連結され得る。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2個のアミノ酸を含有しなければならないが、タンパク質の配列またはペプチドの配列を構成することができるアミノ酸の最大数に関する制限はない。本明細書で使用される場合、用語「アミノ酸」は、天然および/または非天然のあるいは合成のアミノ酸（グリシンを含めて）、およびDとL両方の光学異性体、アミノ酸類似体、ならびにペプチドミメティクスを指す。

30

【 0 0 4 7 】

用語「単離された」または「組み換え型の」は、DNAまたはRNAなどの核酸に関して本明細書で使用される場合、巨大分子ならびにポリペプチドの天然源中にそれぞれ存在する、他のDNAまたはRNAから分離された分子を指す。用語「単離されたまたは組み換え型の核酸」は、フラグメントとしては天然には存在せず、天然状態では発見されないであろう核酸フラグメントを含むことが意図される。用語「単離された」はまた、本明細書では、他の細胞のタンパク質から単離された、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、およびタンパク質を指すためにも使用され、精製されたポリペプチドと組み換え型のポリペプチドの両方を包含することが意図される。他の実施形態では、用語「単離されたまたは組み換え型の」は、天然には通常伴われない、細胞、組織、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、またはそれらのフラグメント（1つまたは複数）が、細胞のおよび他の構成物から分離されることを意味する。例えば、単離された細胞は、異なる表現型または遺伝子型の組織または細胞から分離された細胞である。単離されたポリヌクレオチドは、その自然状態または天然の環境には、例えば染色体上には通常伴われない3'および5'隣接ヌクレオチドから分離される。当業者には明らかであるように、天然には存在しないポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、またはそれらのフラグメント（1つまたは複数）は、天然に存在するこれらの等価物と見分けられるための「単離」を必要としない。

40

【 0 0 4 8 】

50

本発明が、ポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチドまたは抗体に関する場合、明確な記述がなく、別段の指定がなければ、等価物またはこうしたものの生物学的等価物は、本発明の範囲内であると意図されることが推測されるべきである。本明細書で使用される場合、用語「その生物学的等価物」は、基準のタンパク質、抗体、ポリペプチドまたは核酸に言及する場合、「その等価物」と同義であると意図され、所望の構造または機能性を維持しながら最小限の相同性を示すものを意味する。本明細書で具体的に列挙しなければ、本明細書で言及するあらゆるポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはタンパク質はまた、その等価物も含むことが考えられる。例えば、等価物は、少なくとも約70%の相同性または同一性、または約80%の相同性または同一性、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または98%パーセントの相同性または同一性を意味し、基準のタンパク質、ポリペプチド、または核酸と実質的に等価な生物活性を示す。別の実施態様では、この用語は、厳密性 (stringency) の高い条件下で基準のポリヌクレオチドまたはその相補鎖とハイブリッド形成するポリヌクレオチドを意味する。

【0049】

別の配列と、ある種の割合 (例えば、80%、85%、90%または95%) の「配列同一性」を有するポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域 (またはポリペプチドまたはポリペプチド領域) は、整列させた場合に、2つの配列を比較すると、その割合の塩基 (またはアミノ酸) が同じであることを意味する。配列比較および相同性または配列同一性 (%) は、例えば「Current Protocols in Molecular Biology」(Ausubelら編、1987) Supplement 30、セクション7.7.18、表7.7.1に記載されているものなどの、当分野で知られたソフトウェアプログラムを使用して決定することができる。好ましくは、初期パラメータは、配列比較のために使用される。好ましい配列比較プログラムは、初期パラメータを使用するBLASTである。具体的には、好ましいプログラムは、以下の初期パラメータを使用するBLASTNおよびBLASTPである：遺伝暗号 (Genetic-code) = 標準 (standard) ; フィルター (filter) = なし (none) ; 鎖 (strand) = 両方 (both) ; カットオフ (cutoff) = 60 ; 期待値 (expect) = 10 ; 行列 (Matrix) = BLOSUM62 ; 表示 (Descriptions) = 50 配列 (50 sequence) ; 並べ替え (sort-by) = HIGH SCORE ; データベース (Databases) = non-redundant、GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+SwissProtein+SPupdate+PIR。これらのプログラムの詳細は、以下のインターネットアドレスで見ることができる：ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。

【0050】

「相同性」または「同一性」または「類似性」は、2つのペプチド間または2つの核酸分子間の配列類似性を指す。相同性は、比較の目的で整列され得る各配列におけるある位置を比較することによって決定することができる。比較される配列におけるある位置を、同じ塩基またはアミノ酸が占める場合、これらの分子は、この位置で相同である。配列間の相同性の程度は、配列が共通して有するマッチングまたは相同位置の数の関数である。「非関連」または「非相同」配列は、本発明の配列のうちの1つと、30%未満の同一性または25%未満の同一性、20%未満の同一性、または10%未満の同一性を有する。

【0051】

「相同性」または「同一性」または「類似性」はまた、基準のポリヌクレオチドまたはその相補鎖と厳密な (stringent) 条件下でハイブリッド形成する2つの核酸分子を指すこともできる。

【0052】

「ハイブリッド形成」は、1つまたは複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合を介して安定化された複合体を形成するような反応を指す。水

10

20

30

40

50

素結合は、ワトソン - クリック塩基対合、フーグスティーン結合によって、またはあらゆる他の配列特異的な方式で生じることができる。複合体は、二重鎖構造を形成する2本の鎖、多重鎖複合体を形成する3本以上の鎖、単一の自己ハイブリッド形成する鎖、またはこれらのもののあらゆる組み合わせを含むことができる。ハイブリッド形成反応は、PCR反応の開始、またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的切断などの、より大規模なプロセスにおけるステップを構成することができる。

【0053】

厳密なハイブリッド形成条件の例としては、以下が挙げられる：約25 ~ 約37のインキュベーション温度；約6×SSC ~ 約10×SSCのハイブリッド形成緩衝液濃度；約0% ~ 約25%のホルムアミド濃度；および約4×SSC ~ 約8×SSC洗浄液。中程度の(moderate)ハイブリッド形成条件の例としては、以下が挙げられる：約40 ~ 約50のインキュベーション温度；約9×SSC ~ 約2×SSCの緩衝液濃度；約30% ~ 約50%のホルムアミド濃度；および約5×SSC ~ 約2×SSCの洗浄液。高い厳密性の条件の例としては、以下が挙げられる：約55 ~ 約68のインキュベーション温度；約1×SSC ~ 約0.1×SSCの緩衝液濃度；約55% ~ 約75%のホルムアミド濃度；および約1×SSC、0.1×SSC、または脱イオン水の洗浄液。一般に、ハイブリッド形成のインキュベーション時間は、5分 ~ 24時間であり、1、2、またはそれ以上の回数の洗浄ステップを伴い、洗浄インキュベーション時間は、約1、2、または15分である。SSCは、0.15M NaClおよび15mMクエン酸緩衝液である。他の緩衝液系を使用するSSCの等価物も用いることができることを理解されたい。

10

20

【0054】

本明細書で使用される場合、用語「処置すること」、「処置」などは、所望の薬理的および/または生理的効果を得ることを意味するために本明細書で使用される。効果は、障害またはその徴候もしくは症状を完全にまたは部分的に予防することという意味で予防的であり得る、かつ/または、障害および/または障害に起因する有害作用の部分的または完全な治癒という意味で治療的であり得る。

【0055】

「予防する」ことは、障害または影響を受けやすい組織または被験体において障害または影響をin vitroまたはin vivoで予防することを意味する。こうしたものの例は、バイオフィルムを生じることが知られている微生物に感染している組織におけるバイオフィルムの形成を予防することである。

30

【0056】

「薬学的に受容可能な担体」は、本発明の組成物に使用することができるあらゆる希釈剤、賦形剤、または担体を指す。薬学的に受容可能な担体としては、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質(ヒト血清アルブミンなど)、緩衝物質(リン酸塩など)、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和した植物性脂肪酸の部分的なグリセリド混合物、水、塩または電解質(硫酸プロタミンなど)、リン酸水素二ナトリウム、リン酸カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイドシリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロースベースの物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレン - ポリオキシプロピレン - ブロック重合体、ポリエチレングリコール、および羊毛脂が挙げられる。適切な薬剤担体は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、Mack Publishing Company、すなわちこの分野における標準の参考書に記載されている。適切な薬剤担体は、意図される形の投与に対して選択され(すなわち、経口錠剤、カプセル、エリキシル剤、シロップなど)、従来の医薬的慣例に一致していることが好ましい。

40

【0057】

「投与」は、処置の過程全体を通して、単回投与で、連続的に、または断続的に行うことができる。投与の最も有効な手段および投薬量を決定する方法は、当業者に知られてお

50

り、治療法のために使用される組成物、治療法の目的、処置される標的細胞、および処置される被験体によって変わることとなる。単回または複数回投与は、処置を行う医師によって選択される投与レベルおよび様式で実施することができる。薬剤を投与する適切な剤形および方法は、当分野で知られている。投与経路も決定することができ、最も有効な投与経路を決定する方法は、当業者に知られており、処置のために使用される組成物、処置の目的、処置される被験体の健康状態または疾患の病期、および標的細胞または組織によって変わることとなる。投与経路の非限定的な例としては、経口投与、経鼻投与、注射、および局所適用が挙げられる。

【0058】

用語「有効量」は、有益なまたは所望の結果または効果を達成するのに十分な量を指す。治療的または予防的用途においては、有効量は、問題となっている状態の種類および重症度、ならびに個々の被験体の特性（全身健康状態、年齢、性別、体重、および医薬組成物への耐性など）に依存することとなる。免疫原性組成物においては、いくつかの実施形態では、有効量は、病原体に対する防御反応をもたらすのに十分な量である。他の実施形態では、免疫原性組成物の有効量は、抗原に対する抗体産生をもたらすのに十分な量である。いくつかの実施形態では、有効量は、受動免疫を与える必要のある被験体に受動免疫を与えるために必要とされる量である。免疫原性組成物に関しては、いくつかの実施形態では、有効量は、上に記述した要因に加えて、意図される使用、ある特定の抗原性化合物の免疫原性の程度、および被験体の免疫系の健康/応答性に依存することとなる。当業者は、これらの要因および他の要因に応じて適切な量を決定することができるであろう。

【0059】

in vitro 適用の場合、いくつかの実施形態では、有効量は、問題となっている適用のサイズおよび性質に依存することとなる。有効量はまた、*in vitro* 標的の性質および感受性ならびに使用されている方法にも依存することとなる。当業者は、これらの考慮事項および他の考慮事項に基づいて、有効量を決定することができるであろう。有効量は、実施形態に応じて、組成物の1回または複数回の投与を含むことができる。

【0060】

該薬剤および組成物は、医薬品の製造に、また、医薬組成物中の活性成分などの、従来の手順に従う投与によるヒトおよび他の動物の処置のために、使用することができる。

【0061】

本発明の薬剤は、任意の適切な投与経路によって、治療法のために投与することができる。好ましい経路が、レシピエントの状態および年齢ならびに処置される疾患によって変わることとなることも理解されるであろう。

【0062】

固相支持体の例としては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および変性セルロース、ポリアクリルアミド、斑れい岩、および磁鉄鉱が挙げられる。この担体の性質は、ある程度可溶性、または不溶性であり得る。支持体材料は、結合した分子がポリヌクレオチド、ポリペプチド、または抗体に結合することが可能である限り、事実上、いかなる可能な構造配置もとることができる。したがって、支持体の構造配置は、ビーズがそうであるように球状、または試験管の内部表面もしくは棒の外部表面がそうであるように円柱状であり得る。あるいは、シート、試験片など、またはポリスチレンビーズなどの表面は、平らであり得る。当業者は、抗体または抗原と結合させるための多くの適切な担体を知っている、あるいはルーチン実験の使用によって確認することができるであろう。

【0063】

本明細書で使用される場合、「抗体」には、全抗体およびあらゆる抗原結合フラグメントまたはこれらの単鎖が含まれる。したがって、用語「抗体」には、免疫グロブリン分子の少なくとも一部を含む分子を含有するあらゆるタンパク質またはペプチドが含まれる。こうしたものの例としては、重鎖もしくは軽鎖の相補性決定領域(CDR)またはそのリガンド結合部分、重鎖または軽鎖可変領域、重鎖または軽鎖定常領域、フレームワーク(

10

20

30

40

50

FR)領域またはそのあらゆる部分、または結合タンパク質の少なくとも一部分が挙げられるが、これらに限定されない。

【0064】

抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであり得、任意の適切な生物源、例えば、ネズミ、ラット、ヒツジ、またはイヌ科の動物から単離することができる。

【0065】

「免疫応答」は、概して、外来物質に対するリンパ球の抗原特異的な応答を指す。免疫応答を引き起こすことができるいかなる物質も、「免疫原性」とは限らない。「免疫原」という。すべての免疫原は抗原であるが、すべての抗原が免疫原性とは限らない。本発明の免疫応答は、体液性（抗体の活動を介する）または細胞性（T細胞活性化を介する）であり得る。

10

【0066】

本明細書で使用される場合、用語「被験体において免疫応答を誘発すること」は、当分野でよく理解されている用語であり、被験体に抗原（またはエピトープ）を導入した後、被験体に抗原（またはエピトープ）を導入する前の免疫応答（もしあれば）と比較して、ある抗原（またはエピトープ）に対する免疫応答の、少なくとも約2倍、より好ましくは少なくとも約5倍、より好ましくは少なくとも約10倍、より好ましくは少なくとも約100倍、さらに好ましくは少なくとも約500倍、さらに好ましくは少なくとも約1000倍、またはそれ以上の増大を検出または測定することができることを意味する。抗原（またはエピトープ）に対する免疫応答としては、抗原特異的な（またはエピトープ特異的な）抗体の産生、およびその表面上に抗原（またはエピトープ）と特異的に結合する分子を発現する免疫細胞の産生が挙げられるが、これらに限定されない。所与の抗原（またはエピトープ）に対する免疫応答が誘発されたかどうかを決定する方法は、当分野で周知である。例えば、抗原特異的な抗体は、限定はされないがELISA（ここでは、例えば、サンプル中の抗体と、固定された抗原（またはエピトープ）との結合が、検出可能な程度に標識された第2の抗体（例えば、酵素標識したマウス抗ヒトIg抗体）を用いて検出される）を含めて、当分野で知られている様々なイムノアッセイのいずれかを使用して検出することができる。

20

【0067】

用語「免疫応答を調節する」は、免疫応答を誘発すること（増大させること、引き起こすこと）；および免疫応答を低下させること（抑制すること）を含む。免疫調節方法（またはプロトコル）は、被験体における免疫応答を調節するものである。

30

【0068】

ポリペプチド

「HMGドメイン」または「高移動度（high mobility group）（HMG）ボックスドメイン」は、DNAとの結合に関与するアミノ酸配列を指す（Strosら、「Cell Mol Life Sci. 64（19-20）：2590-606（2007）」。一実施形態では、HMGボックスドメインの構造は、不規則に配列した3つのヘリックスからなる。別の実施形態では、HMGボックスドメインは、タンパク質が、（キンクしたまたは巻き戻された）非B型DNA構造と、高い親和性で結合することを可能にする。HMGボックスドメインは、高移動度タンパク質内に見ることができ、転写、複製、およびDNA修復などのDNA依存性プロセス（これらはすべて、クロマチンの構造の変化を必要とする）の調節に関与する（Thomas（2001）「Biochem. Soc. Trans.」29（Pt 4）：395-401）。

40

【0069】

「HMGボックスドメインを含むポリペプチド」または「HMGボックスタンパク質」は、1つまたは複数のHMGボックスドメインを含有するポリペプチドまたはタンパク質を指す。HMGボックスドメインの特定は、BLASTTMプログラム、または配列を既知のHMGボックスドメイン配列と比較することによって実施することができる。HMGボックスタンパク質は、様々な真核微生物中に見られ、配列依存性および配列非依存性の

50

DNA認識に基づいて、おおまかに2群に分けることができる；前者は通常、1つのHMGボックスモチーフを含有するのに対し、後者は複数のHMGボックスモチーフを含有することができる。HMGボックスドメインを含むポリペプチドの非限定的な例としては、以下が挙げられる：クロマチンのHMG1(HMGB1)、HMG2(HMGB2)、HMGB3、およびHMGB4非ヒストン性成分；特質的な生殖腺形成に關与するSRY(性別決定領域Yタンパク質)；転写因子のSOXファミリー(Harleyら(2003)「Endocr. Rev.」24(4):466-87)；器官形成および胸腺細胞分化の調節に關与する配列特異的LEF1(リンパ系エンハンサー結合因子1)およびTCF-1(T細胞因子1)(Labbeら(2000)「Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.」97(15):8358-63)；転写および複製に關与する構造特異的認識タンパク質SSRP；MTF1ミトコンドリア転写因子；RNAポリメラーゼIによる転写に關与する核小体転写因子UBF1/2(上流結合因子)；Abf2酵母ARS結合因子(Chouら(2001)「Biochim. Biophys. Acta.」1522(3):175-86)；酵母転写因子Ixr1、Rox1、Nhp6b、およびSpp41；真菌の有性生殖に關与する接合型タンパク質(MAT)(Barveら(2003)「Fungal Genet. Biol.」39(2):151-67)；およびYABBY植物特異的転写因子。

【0070】

HMGボックスドメインを含むポリペプチドの例示的配列としては、NP__002119(ヒトHMGB1)、NP__001124160(ヒトHMGB2)、NP__005333(ヒトHMGB3)、およびNP__660206(ヒトHMGB4)が挙げられる。例えば、ヒトHMGB1の約9から約76のアミノ酸残基は、HMGボックスドメインを形成し、約90から約138のアミノ酸残基は、別のHMGボックスドメインを形成する。例えば、これらの2つのHMGボックスドメインのいずれかを含有するHMGB1フラグメントはまた、本開示の趣旨の範囲内である、HMGボックスドメインを含むポリペプチドを構成する。

【0071】

したがって、本開示で意図されるようなHMGボックスドメインを含むポリペプチドは、上で記述したタンパク質、1つまたは複数のHMGボックスドメインを含有するこうしたタンパク質のフラグメント、あるいはこれらのタンパク質またはフラグメントの等価物のいずれかを意図する。本明細書で使用される場合、ポリペプチドの等価物は、基準のポリペプチドと少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%同一である配列を指す。いくつかの実施態様では、ポリペプチドの等価物は、ポリペプチドの意図される機能および/または構造特性(例えばHMGボックスドメインを含有すること)を保持する。一実施態様では、等価なポリペプチドは、HMGボックスドメインと少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%同一であるドメインを含む。いくつかの実施態様では、こうした等価なドメインは、HMBボックスドメインの機能および/または構造特性(例えば、HMBボックス結合標的と結合すること)を保持する。一実施態様では、等価なポリペプチドは、厳密な条件下でポリペプチドとハイブリッド形成することができる。

【0072】

HMGボックスドメインを含むポリペプチドとしては、原核生物および真核生物宿主細胞由来の、野生型および組み換えによって生じたポリペプチドおよびタンパク質、ならびに変異タンパク質、類似体、およびこれらのフラグメントが挙げられることが意図される。いくつかの実施形態では、この用語にはまた、抗体および抗イディオタイプ抗体が含まれる。こうしたポリペプチドは、下に明らかにする方法を使用して単離または生成することができる。

10

20

30

40

50

【0073】

これらのタンパク質およびポリペプチドは、精製、化学合成、および組み換え的方法を含めた、当業者に知られているいくつかのプロセスによって入手可能である。ポリペプチドは、抗体を用いる免疫沈降などの方法、ならびにゲル濾過、イオン交換、逆相、および親和性クロマトグラフィーなどの標準の技術によって、宿主細胞系などの調製物から単離することができる。こうした方法論については、例えば、Deutscherら(1999)「Guide To Protein Purification: Methods In Enzymology」(Vol. 182, Academic Press)を参照のこと。したがって、本発明はまた、これらのポリペプチドを得るためのプロセス、ならびにこうしたプロセスによって入手可能であるおよび得られる生成物も提供する。

10

【0074】

これらのポリペプチドはまた、Perkin/Elmer/Applied Biosystems社(Model 430Aまたは431A)(Foster City, CA, USA)によって製造されたものなどの、市販品として入手できる自動ペプチド合成機を使用する化学合成によって得ることができる。合成されたポリペプチドは、沈殿させる、および例えば高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によってさらに精製することができる。したがって、本発明はまた、タンパク質の配列および試薬(アミノ酸および酵素など)を提供し、適切な配向および直線配列でこれらのアミノ酸を結合することによって、本発明のタンパク質を化学的に合成するためのプロセスも提供する。

20

【0075】

あるいは、これらのタンパク質およびポリペプチドは、本明細書に記述した宿主細胞およびベクターシステムを使用して、例えば、Sambrookら(1989)上記、に記載されている通りの、周知の組み換え的方法によって得ることができる。

【0076】

本発明のポリペプチドはまた、様々な固相担体(インプラント、ステント、ペースト、ゲル、歯科用インプラント、もしくは医療用インプラントなど)、または液相担体(ビーズ、滅菌したまたは水性の溶液、薬学的に受容可能な担体、懸濁液、または乳濁液など)と組み合わせることができる。非水性溶媒の例としては、プロピルエチレングリコール、ポリエチレングリコール、および植物油が挙げられる。抗体を調製するまたは*in vivo*での免疫応答を誘発するために使用する場合、担体はまた、特異的な免疫応答を非特異的に増強するのに有用であるアジュバントも含むことができる。当業者は、アジュバントが必要とされるかどうかを容易に決定し、1つを選択することができる。例示的に過ぎないが、適切なアジュバントとしては、フロイントの完全なおよび不完全な金属塩およびポリヌクレオチドが挙げられ、これらに限定されない。他の適切なアジュバントとしては、モノホスホリルリポドA(MPL)、大腸菌の易熱性エンテロトキシンの突然変異型誘導体、コレラ毒素の突然変異型誘導体、CPGオリゴヌクレオチド、およびスクアレンから得られるアジュバントが挙げられる。

30

【0077】

治療方法

本開示の一実施形態は、DNABIIポリペプチドまたはタンパク質と微生物DNAとの結合を阻害する、競合する、または低減するための方法であって、DNABIIポリペプチドもしくはタンパク質または微生物DNAを、HMGボックスドメインを含むポリペプチドと接触させ、それによって、DNABIIタンパク質またはポリペプチドと微生物DNAとの結合を阻害する、競合する、または低減する工程を含む方法を提供する。

40

【0078】

1つまたは複数のHMGボックスドメインを有するポリペプチドは、当分野で知られており、また、上でさらに説明している。1つのこうした例は、真核生物由来のHMG B1、すなわち非特異的なDNA結合タンパク質である。HMG B1は、アポトーシスではなくネクローシス中に細胞から放出され、また、エンドトキシンおよび炎症誘発性サイトカインで刺激されたマクロファージによって放出されることが知られていた。放出されたH

50

MGB1は、好中球を集め、炎症を促すためのサイトカインとして作用する。HMGB1はまた、樹状細胞を活性化し、その機能的成熟およびリンパ節ケモカインに対する応答を促す。

【0079】

HMGB1は、DNAの副溝において結合するが、DNABIIファミリータンパク質と相同ではない。しかし、実施例2に示したデータは、HMGB1が、湾曲DNA構造に対する高い親和性を有し、かつDNABIIと機能的に類似していることを示す。

【0080】

本開示の別の実施形態は、微生物バイオフィルムを阻害する、予防する、または破壊するための方法であって、該バイオフィルムを、HMGボックスドメインを含むポリペプチドと接触させ、それによって、微生物バイオフィルムを阻害する、予防する、または破壊する工程を含む方法を提供する。いくつかの実施態様では、接触は、*in vitro*または*in vivo*である。

10

【0081】

本開示のさらに別の実施形態は、被験体においてバイオフィルムを阻害する、予防する、または破壊する方法であって、HMGボックスドメインを含む有効量のポリペプチドを被験体に投与し、それによって、微生物バイオフィルムを阻害する、予防する、または破壊する工程を含む方法を提供する。

【0082】

提供されるのはまた、別の実施形態では、被験体においてバイオフィルムを生じる微生物感染を阻害する、予防する、または処置するための方法であって、HMGボックスドメインを含む有効量のポリペプチドを被験体に投与し、それによって、被験体においてバイオフィルムを生じる微生物感染を阻害する、予防する、または処置する工程を含む方法である。

20

【0083】

上の実施形態のいずれかの一実施態様では、HMGボックスドメインを含む、または本質的にHMGボックスドメインからなる、またはHMGボックスドメインからなるポリペプチドはまた、以下のうちの1つまたは複数を含む、または本質的に以下のうちの1つまたは複数からなる、または以下のうちの1つまたは複数からなる：

(a) 1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、または本質的に1つまたは複数のHMGボックスドメインからなる、または1つまたは複数のHMGボックスドメインからなる単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMGB1またはそのフラグメント；

30

(b) 1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、または本質的に1つまたは複数のHMGボックスドメインからなる、または1つまたは複数のHMGボックスドメインからなる単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMGB2またはそのフラグメント；

(c) 1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、または本質的に1つまたは複数のHMGボックスドメインからなる、または1つまたは複数のHMGボックスドメインからなる単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMGB3またはそのフラグメント；

(d) 1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、または本質的に1つまたは複数のHMGボックスドメインからなる、または1つまたは複数のHMGボックスドメインからなる単離されたまたは組み換え型のタンパク質HMGB4またはそのフラグメント；または

40

(e) (a)、(b)、(c)、または(d)のいずれかと少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%同一であるポリペプチド。

【0084】

別の実施態様では、HMGボックスドメインを含むポリペプチドは、1つまたは複数のHMGボックスドメインを含む、または本質的に1つまたは複数のHMGボックスドメインからなる、または1つまたは複数のHMGボックスドメインからなる、単離されたまた

50

は組み換え型のタンパク質 H M G B 1、H M G B 1 と少なくとも約 7 0 %、または少なくとも約 7 5 %、または少なくとも約 8 0 %、または少なくとも約 8 5 %、または少なくとも約 9 0 %、または少なくとも約 9 5 %、または少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 % 同一であるポリペプチド、またはそれらのフラグメントを含む、または本質的にこれらからなる、またはこれらからなる。

【 0 0 8 5 】

いくつかの実施態様では、H M G ボックスドメインを含むポリペプチドは、上に列挙したあらゆるポリペプチドに対する生物学的等価物を含む、または本質的に該生物学的等価物からなる、または該生物学的等価物からなる。

【 0 0 8 6 】

いくつかの実施態様では、単離されたまたは組み換え型のタンパク質は、哺乳動物タンパク質である。特定の実施態様では、哺乳動物タンパク質は、ヒトタンパク質である。

【 0 0 8 7 】

上の方法のいずれかは、有効量の 1 種または複数の抗菌物質、抗原性ペプチド、またはアジュバントを被験体に投与することをさらに含むことができる、または本質的にこれらを投与することからなり得る、またはこれらを投与することからなり得る。被験体は、一実施態様では、非ヒト動物またはヒト患者である。

【 0 0 8 8 】

ポリペプチドは、局所的に、経皮的に、舌下に、直腸に、膺に、眼に、皮下に、筋肉内に、腹腔内に、尿道に、鼻腔内に、吸入によって、または経口的に、を含む方法によって投与される。

【 0 0 8 9 】

いくつかの実施態様では、被験体は、小児科の患者であり、ポリペプチドは、小児科の患者用の処方物で投与される。

【 0 0 9 0 】

上の実施形態のいずれかでは、バイオフィームは、表 1 に特定される微生物由来の微生物 DNA を含む可能性がある。

【 0 0 9 1 】

一実施形態では、ポリペプチドは、微生物感染に対して局所的に投与される。

【 0 0 9 2 】

一実施形態では、本開示は、免疫応答の誘発または提供を必要とする被験体において免疫応答を誘発するまたは提供するための方法であって、H M G ボックスドメインを含む有効量のポリペプチドを被験体に投与することを含む、または本質的にこれらを投与することからなる、またはこれらを投与することからなる方法を提供する。別の実施形態では、投与は、免疫応答が所望される場所に限局的なものである。H M G ボックスドメインを含むポリペプチドの例は、上に記述している。

【 0 0 9 3 】

単離されたまたは組み換え型のタンパク質は、哺乳動物タンパク質、または特定の実施態様ではヒトタンパク質であり得る。被験体は、いくつかの実施態様では、非ヒト動物またはヒト患者である。

【 0 0 9 4 】

本発明の薬剤および組成物は、他の抗菌剤および/または表面抗原と同時にまたは連続して投与することができる。ある特定の実施態様では、投与は、感染の部位に対して局所的である。投与の他の非限定的な例としては、経皮的に、舌下に、直腸に、膺に、眼に、皮下に、筋肉内に、腹腔内に、鼻腔内に、吸入によって、または経口的に、を含む、1 つまたは複数の方法によるものが挙げられる。

【 0 0 9 5 】

提供されるのはまた、一実施形態では、バイオフィームを破壊すること、またはバイオフィームを生じる微生物感染を阻害する、予防する、または処置することにおける医薬品の製造のための、H M G ボックスドメインを含む、または本質的に H M G ボックスドメイ

10

20

30

40

50

ンからなる、またはHMGボックスドメインからなる、上に記述したポリペプチドのいずれかの使用である。

【0096】

これらの方法のいくつかについては、接触は、*in vitro*または*in vivo*で実施することができる。接触が*in vitro*である場合、該方法は、動物または臨床研究の前に本発明の薬剤の有効性を決定するための手段を提供し、また、本発明の薬剤が追加の抗菌物質とともに相乗的に働くかどうかを決定するために使用することができる。動物モデルにおいて*in vivo*で実施される場合、該方法は、ヒト患者における研究の前に本発明の薬剤の有効性を決定するための手段を提供し、また、本発明の薬剤が追加の抗菌物質とともに相乗的に働くかどうかを決定するために使用することができる

10

本発明によって処置することができる微生物感染および疾患としては、表1に特定される微生物、例えば、*Streptococcus agalactiae*、*Neisseria meningitidis*、*Treponemes denticola*、*parvillum*、*Burkholderia cepacia*、または*Burkholderia pseudomallei*による感染が挙げられる。一実施態様では、微生物感染は、*Haemophilus influenzae* (分類不能型)、*Moraxella catarrhalis*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus pyogenes*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Mycobacterium tuberculosis*のうちの1つまたは複数である。これらの微生物感染は、上気道、中気道、または下気道 (耳炎、副鼻腔炎、または気管支炎)、そして慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の増悪、慢性の咳、嚢胞性線維症 (CF) の合併症および/または主因、および院外感染性肺炎 (CAP) にも存在する可能性がある。

20

【0097】

感染症はまた、口腔内に生じ (齲蝕、歯周病)、*Streptococcus mutans*、*Porphyromonas gingivalis*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*によって引き起こされる可能性がある。感染症はまた、皮膚に局限され (膿瘍、「ブドウ球菌」感染、膿痂疹、火傷の二次感染、ライム病)、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Pseudomonas aeruginosa*、および*Borrelia burgdorferi*によって引き起こされる可能性がある。尿路の感染症 (UTI) も、処置することができる、これは一般的に、大腸菌によって引き起こされる。消化管の感染症 (GI) (下痢、コレラ、胆石、胃潰瘍) は一般的に、*Salmonella enterica serovar*、*Vibrio cholerae*、および*Helicobacter pylori*によって引き起こされる。生殖器官の感染症は一般的に、*Neisseria gonorrhoeae*によって引き起こされる。膀胱のまたは留置器具の感染症は、*Enterococcus faecalis*によって引き起こされる可能性がある。一般的に様々な細菌によって引き起こされる、埋め込み型の人工器具 (人工股関節または人工膝置換体または歯科用インプラントなど) あるいはポンプまたはモニタリングシステムなどの医療器具に伴われる感染症は、本発明の方法によって処置することができる。これらの器具は、本明細書に記述する通りの薬剤でコーティングまたは該薬剤を結合させることができる。

30

40

【0098】

*Streptococcus agalactiae*によって引き起こされる感染症は、新生児における細菌性敗血症の主な原因である。こうした感染症も、本発明の方法によって処置することができる。同様に、髄膜炎を引き起こす可能性がある*Neisseria meningitidis*によって引き起こされる感染症も、処置することができる。

【0099】

したがって、本発明の方法に適用可能な投与経路としては、鼻腔内、筋肉内、気管内、

50

皮下、皮内、局所適用、静脈内、直腸内、経鼻、経口、および他の経腸および非経口投与経路が挙げられる。投与経路は、所望される場合、組み合わせることもできるし、薬剤および/または所望の効果に応じて調節することもできる。活性な薬剤は、単回投与または複数回投与で投与することができる。送達に適したこれらの方法および経路の実施形態としては、全身的または局所的経路が挙げられる。一般に、本発明の方法に適した投与経路としては、経腸、非経口、または吸入経路が挙げられるが、これらに限定されない。

【0100】

吸入投与以外の非経口投与経路としては、局所、経皮、皮下、筋肉内、眼窩内、関節内、脊髄内、胸骨内、および静脈内経路、すなわち、消化管を通すのではないあらゆる投与経路が挙げられるが、これらに限定されない。非経口投与は、阻害剤の全身的または局所的送達をもたらすために実施することができる。全身的送達が所望される場合、投与は一般的に、医薬調製物の侵襲的または全身吸収型の局所または粘膜投与を伴う。

10

【0101】

本発明の化合物はまた、経腸投与によって被験体に送達することができる。投与の経腸経路としては、経口および直腸内（例えば坐剤を使用する）送達も挙げられるが、これらに限定されない。

【0102】

皮膚または粘膜を介する活性剤の投与の方法としては、適切な医薬調製物の局所適用、経皮膚（transcutaneous）伝達、経皮伝達、注射、および表皮投与が挙げられるが、これらに限定されない。経皮伝達については、吸収プロモーターまたはイオン導入法が、適切な方法である。イオン導入的伝達は、無傷の皮膚を通して、電気パルスによって生成物を数日またはそれ以上の期間、持続的に送達する、市販品として入手できる「パッチ」を使用して行うことができる。

20

【0103】

本発明の方法の種々の実施形態では、活性剤は、継続的に毎日、少なくとも1日1回（QD）、および種々の実施形態では1日に2回（BID）、3回（TID）、または4回、経口的に投与されることとなる。一般的に、治療的に有効な1日量は、少なくとも約1mg、または少なくとも約10mg、または少なくとも約100mg、または約200～約500mg、および化合物によっては時折、最高で約1gから約2.5gもの量となる。

30

【0104】

投薬は、カプセル、錠剤、経口用懸濁剤、筋肉内注射のための懸濁剤、静脈内注入のための懸濁剤、局所適用のためのゲルまたはクリーム、または関節内注射のための懸濁剤を使用して、本発明の方法に従って行うことができる。

【0105】

本発明に記述する組成物の投薬量、毒性、および治療有効性は、例えばLD50（集団の50%に対して致死的な用量）およびED50（集団の50%において治療的に有効な用量）を決定するための、細胞培養または実験動物における標準の医薬手順によって決定することができる。毒性と治療効果の間の用量比は、治療指数であり、これは、LD50/ED50比として表すことができる。高い治療指数を示す組成物が好ましい。毒性の副作用を示す化合物も使用することができるが、感染していない細胞へのダメージの可能性を最小限にし、それによって副作用を減らすために、こうした化合物を罹患組織の部位にターゲティングする送達システムを設計するように注意を払うべきである。

40

【0106】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータを、ヒトにおける使用のための投薬量の範囲を求めるのに使用することができる。こうした化合物の投薬量は、毒性をほとんどまたはまったく伴わない、ED50を含めた血中濃度の範囲内にあることが好ましい。投薬量は、用いられる剤形および利用される投与経路に応じた範囲内で変動し得る。該方法に使用される任意の化合物については、治療的に有効な用量は、細胞培養アッセイから最初に推定することができる。用量は、細胞培養において決定される通りのIC50（

50

すなわち、症状の最大の半分の阻害を実現する、試験化合物の濃度)を含めた循環血漿濃度範囲を得るための動物モデルにおいて求めることができる。こうした情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するために使用することができる。血漿中の濃度は、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

【0107】

いくつかの実施形態では、治療的または予防的効果を実現するのに十分な組成物の有効量は、投与あたり体重1キログラムあたり約0.000001mgから投与あたり体重1キログラムあたり約10,000mgの範囲である。適切には、投薬量範囲は、投与あたり体重1キログラムあたり約0.0001mgから投与あたり体重1キログラムあたり約100mgである。投与は、初回投与とそれに続く1回または複数回の「追加免疫」投与として提供することができる。追加免疫投与は、初回投与の、1日、2日、3日、1週間、2週間、3週間、1か月、2か月、3か月、6か月、もしくは12か月後に提供することができる。いくつかの実施形態では、追加免疫投与は、投与前の被験体の応答の評価後に投与することができる。

10

【0108】

当業者は、限定はされないが、疾患または障害の重症度、以前の処置、全身健康状態、および/または被験体の年齢、ならびに存在する他の疾患を含めたある種の要因が、被験体を効率的に処置するのに必要とされる投薬量およびタイミングに影響を与える可能性があることを理解するであろう。さらに、本明細書に記述する治療的に有効な量の治療用組成物を用いる、被験体の処置は、単回処置または一連の処置を含むことができる。

20

【0109】**併用療法**

本発明の組成物および関連する方法は、他の治療法の適用と組み合わせて使用することができる。こうした治療法としては、DNアーゼ酵素、抗生物質、抗菌物質、または他の抗体の投与が挙げられるが、これらに限定されない。

【0110】

いくつかの実施形態では、該方法および組成物としては、本開示の組成物と相乗的に作用するデオキシリボヌクレアーゼ(DNアーゼ)酵素、例えばDNアーゼが挙げられる。DNアーゼは、DNA骨格中のホスホジエステル結合の切断を触媒するあらゆる酵素である。DNAの十字型構造だけでなく、様々な2次構造を標的にすることが知られているDNアーゼ酵素の3つの非限定的な例としては、DNアーゼI、T4 Endo VII、およびT7 Endo Iが挙げられる。ある種の実施形態では、DNアーゼと組み合わせた場合、バイオフィルムを不安定化するために必要とされる抗DNABI抗体の有効量は減少する。in vitroで投与される場合、DNアーゼは、アッセイに、またはこの酵素を安定化することが知られている適切な緩衝液中に直接添加することができる。DNアーゼの有効な単位用量およびアッセイ条件は、変動する可能性があり、当分野で知られた手順に従って最適化することができる。

30

【0111】

他の実施形態では、該方法および組成物は、抗生物質および/または抗菌物質と組み合わせることができる。抗菌物質は、細菌、真菌、または原生動物などの微生物の増殖を死滅させるまたは阻害する物質である。バイオフィルムは一般に、抗生物質の作用に対して耐性があるが、本明細書に記述する組成物および方法は、感染症を処置するための従来の治療方法に対する、バイオフィルムを伴う感染症の感受性を高めるために使用することができる。他の実施形態では、本明細書に記述する方法および組成物と組み合わせた抗生物質または抗菌物質の使用によって、抗菌物質および/またはバイオフィルム減少剤の有効量を減らすことが可能になる。本発明の方法と併用するのに有用な抗菌物質および抗生物質のいくつかの非限定的な例としては、アモキシシリン、アモキシシリン クラプラン酸、セフジニル、アジスロマイシン、およびスルファメトキサゾール-トリメトプリムが挙げられる。バイオフィルム減少剤と組み合わせた抗菌物質および/または抗生物質の治療的に有効な用量は、従来の方法によって容易に決定することができる。いくつかの実施形

40

50

態では、バイオフィルム減少剤と組み合わせた抗菌剤の用量は、他の細菌感染症、例えば、感染症の病因にバイオフィルムが含まれないような細菌感染症において有効であることが示されている平均有効用量である。他の実施形態では、用量は、平均有効用量の0.1、0.15、0.2、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.5、3.0、または5倍である。抗生物質または抗菌物質は、抗DNA B I I抗体の添加の前に、添加と同時に、または添加の後に加えることができる。

【0112】

他の実施形態では、該方法および組成物は、細菌感染症を処置する抗体と組み合わせることができる。本明細書に記述する方法および組成物と組み合わせるのに有用な抗体の一例は、非関連(unrelated)外膜タンパク質(例えばOMP P5)に対して作られる抗体である。この抗体を単独で用いる処置は、in vitroでバイオフィルムを減量しない。この抗体とバイオフィルム減少剤との併用療法は、同じ濃度で単独で使用されるいずれかの試薬によって実現されるであろうよりも大きな効果をもたらす。バイオフィルム減少剤またはバイオフィルムを減少させる方法と組み合わせた場合に相乗効果を生じることができる他の抗体としては、抗rsPilA、抗OMP26、抗OMP P2、および抗全OMP調製物が挙げられる。

10

【0113】

本明細書に記述する組成物および方法は、バイオフィルムを伴わない細菌感染症を処置するのに有効であるが、バイオフィルムを伴う細菌感染症を処置するには有効ではないような通常の治療様式に対する、バイオフィルムを伴う細菌感染症の感受性を高めるために使用することができる。他の実施形態では、本明細書に記述する組成物および方法は、バイオフィルムを伴う細菌感染症を処置するのに有効であるが、こうした追加の治療法およびバイオフィルム減少剤または方法の組み合わせによって、相乗効果がもたらされ、その結果、バイオフィルム減少剤または追加の治療薬の有効な用量を減らすことができるような治療様式と組み合わせて使用することができる。他の場合では、こうした追加の治療法およびバイオフィルム減少剤または方法の組み合わせによって、相乗効果がもたらされ、その結果、処置が増進する。処置の増進は、感染症の処置に必要なとされる時間が短くなることによって証明することができる。

20

【0114】

バイオフィルムを減少させるために使用される方法または組成物の前、同時、または後に、追加の治療的処置を追加することができ、これは、同じ製剤内に含有することもでき、別の製剤としてもよい。

30

【0115】

キット

本明細書に記述した通りのin vitroおよびin vivo方法を実施するのに必要な薬剤および指示書を含むキットも主張する。したがって、本発明は、本発明の生物学的薬剤と、本発明の方法を実施する(組織を採集すること、および/または選別を実施すること、および/または結果を分析すること、および/または本明細書で定義される通りの有効量の生物学的薬剤の投与など)ための指示書とを含むことができる、こうした方法を実施するためのキットを提供する。これらは、単独で、または他の適切な抗菌剤と組み合わせて使用することができる。

40

【0116】

一実施形態では、本開示は、バイオフィルムを破壊する、またはバイオフィルムを生じる微生物感染を阻害する、予防する、または処置するのに使用するためのHMGボックスドメインを含むポリペプチドと指示書とを含むキットを提供する。HMGボックスドメインを含むポリペプチドの例は、上に記述している。一実施形態では、このキットは、1種または複数のアジュバント、抗原性ペプチド、または抗菌物質をさらに含む。さらに別の実施形態では、このキットは、液体担体、薬学的に受容可能な担体、固相担体、薬学的に

50

受容可能な担体、インプラント、ステント、ペースト、ゲル、歯科用インプラント、または医療用インプラントの群から選択される担体をさらに含む。

【0117】

以下の実施例は、本発明を例示するが、限定はしないものとする。

【実施例】

【0118】

実施例1．HMGB1抗体の調製

ウェスタンブロットのための方法および材料

1．SDS - Pageゲル (Bio-Rad mini PROTEAN (商標) TG Xゲル カタログ番号456-1093) 上で、1 μ g/ウェルの次の精製タンパク質を泳動させた：IHF、HU、TBP、およびHMGB1。

10

【0119】

2．各ウェルに合計20 μ lを装填し；125Vで泳動させた。

【0120】

3．4 で100Vで1時間、ニトロセルロースに転写した。

【0121】

4．ニトロセルロースを、ロッキングプラットフォーム上で1時間、2% BSA (TTBS中) でプロッキングした。

【0122】

5．1% BSA - TTBS中で、ロッキングプラットフォーム上で1時間、1次抗体と共にインキュベートした。

20

使用される1次抗体および希釈

- ウサギ未処理血清 (1 : 5000)
- ウサギ抗IHF (1 : 10,000)
- ウサギ抗TBP (1 : 10,000)

6．TTBSで3回洗浄した；それぞれ5分の洗浄。

【0123】

7．1% BSA - TTBS中で、ロッキングプラットフォーム上で1時間、2次抗体と共にインキュベートした。2次抗体：ヤギ抗ウサギIgG - HRP (1 : 10,000)。

30

【0124】

8．1洗浄につき5分間、TTBSで3回洗浄した。CN/DABで展開した。

【0125】

図1に示す通り、これらの抗体は、対応するタンパク質に対して特異的である。図2は、ヤギ抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1タンパク質に対して特異的であり、また、その結合は、用量依存的であることをさらに示す。

【0126】

したがって、これらの抗体は、HMGB1と微生物バイオフィルム内のDNA骨格との結合を試験するのに適している。後続の実験は、HMGB1タンパク質が、微生物バイオフィルム内のDNA骨格と結合し、バイオフィルムの破壊および除去をもたらす、宿主由来の免疫応答を可能にすることを示す。

40

【0127】

実施例2

HMGB1は、バイオフィルムDNAとの結合に関してHUおよびIHFと競合する。

【0128】

この実施例は、HMGB1が、湾曲DNA構造に対する高い親和性を有し、バイオフィルム内のDNAとの結合に関してHUおよびIHFと競合し、バイオフィルム増殖を低減させることを実証する。

【0129】

バイオフィルムに対するHMGB1の効果を試験するために、Nontypable

50

Haemophilus influenzae (NTHI) によって産生されたバイオフィルムを、HMGB1を含有する未処理血清単独で、または抗HMGB1抗体を含有する血清で処理した。図3に示す通り、抗体によるHMGB1の減少によって、バイオフィルム増殖が増進し、より薄いバイオフィルム(左下)に比べて、より厚いバイオフィルム(右下)として示された。したがって、バイオフィルムDNA上のHUおよびIHF結合部位に対するHMGB1からの競合が少ないと、バイオフィルムは、強固になる。

【0130】

図4は、HMGB1タンパク質が、哺乳動物の未処理血清中に存在し、ヒト、ウサギ、およびヤギから得られるHMGB1タンパク質が、すべて、調製されたヤギ抗ヒトHMGB1抗体によって認識できることを裏付ける。各血清サンプル中のHMGB1の推定濃度は、それぞれ、80 µgの総タンパク質あたり、約0.8 µg、0.8 µg、および2.8 µgであった。

10

【0131】

HMGB1が、バイオフィルム形成を用量依存的に阻害することが、さらに発見された。例えば、40時間で22.5 µmの厚さまで増殖した滅菌培地sBHI(2 mgヘム/mLと2 mg b-NAD/mLを含むBHI)中のNTHIと比較して、24時間での0.075 µg/mL、0.75 µg/mL、および7.5 µg/mL HMGB1処置は、それぞれ21.5 µm、20.0 µm、および16.5 µmまで、バイオフィルム厚を減少させた(図5)。これは、HMGB1が、HUおよびIHFと同じ結合標的に対して競合することを示す。

20

【0132】

HMGB1とIHFとの間の競合的結合は、二重標識によってさらに裏付けられた。図6に示す通り、HMGB1とIHFは、ヒト気管支肺胞洗浄液(BAL)を埋め込んだOCT(Fisher Scientific社から市販品として入手できるOptimal Cutting Temperature培地、カタログ番号14-373-65)において共局在している。HMGB1の所在は、AlexaFluor 488が結合された抗体を用いて検出し(図6A); IHFの所在は、AlexaFluor 594が結合された抗体を用いて検出し(図6B); 図6C、すなわち図6Aと6Bとを組み合わせた画像は、共局在を示す。

30

【0133】

同様に、中年(middle year)のチンチラにおいて形成されたNTHIバイオフィルム上での、in vivoでの、バイオフィルム上でのHMGB1とIHFとの共局在も観察された(図7)。バイオマスを埋め込んだOCTの連続部分を、ヤギ抗HMGB1(1:25希釈)とウサギ抗IHF(1:200希釈)を使用して、HMGB1とIHFについて同時標識した。標識は、ロバ抗ヤギAlexaFluor 488とロバ抗ウサギAlexaFluor 594を使用して検出した。dsDNAを、DAPIで染色し、白色に疑似カラー処理した。図7のすべての画像において、バイオフィルムDNA上でのHMGB1とIHFとの共局在が観察された。

【0134】

図8のさらなる拡大画像は、HMGB1が、dsDNA鎖の長さに沿って一定間隔で存在し、かつジャンクションではIHFに近接していたことを示す。さらに、スライドの同じ部分の異なるz平面画像(図9)は、HMGB1とIHFが、dsDNAの鎖のジャンクションで両方とも検出され、これらが近接していることを示す。

40

【0135】

しかし、IHFとは異なり、合成のDNA Hollidayジャンクションに結合されたHMGB1の電気泳動移動度(electromobility)シフトアッセイは、HMGB1が、温度を上昇させるとHollidayジャンクション構造の完全性を安定化できないことを示す。(図10)。

【0136】

したがって、この実施例のデータは、HMGB1が、バイオフィルムDNA上の同じ標

50

的への結合について、IHFおよびHUと競合することを示す。したがって、HMGB1によって例示される通り、HMGボックスドメインを含有するタンパク質は、バイオフィルムの形成および増殖を阻害することにおいて有用であり、したがって、バイオフィルムを特徴とする疾患および状態を処置することにおいて有用である。

【0137】

実施例3

この実施例は、中耳感染の処置のための動物モデルを説明する。中耳感染（または中耳炎、OM）は、世界中に非常に蔓延している疾患であり、全世界で1年に5000万～3億3000万人の子供達が悩まされている。OMの社会的経済的負担も大きく、損害額は、米国だけで年間50～60億ドルと推定される。OMの主な細菌性病原体の3種すべてが、*in vitro*と*in vivo*の両方で、バイオフィルムを形成することが知られており、最近、臨床医は、OMの慢性化および再発が、少なくともある程度、中耳腔内の細菌性バイオフィルムの形成によることを認識するようになってきた。OMのあるチンチラモデルでは、若いチンチラに、最初にウイルスによる「風邪」を引かせ、1週間後に細菌を鼻腔内に接種した。「私の子供が風邪をひき、1週間後に耳の感染症にかかった」というようなヒトの状態と同様に、チンチラも、接種の約1週間後に、ウイルス性上気道感染症に罹りながら、細菌性OMを発症するであろう。細菌は、一旦、（耳管の上昇、またはそれに続く中耳洞への直接的攻撃を介して）中耳に到達すると、強固なバイオフィルムを形成することとなる。したがって、本出願人等は、存在するバイオフィルムの迅速な消散をもたらす、本明細書に記述する通りの組成物および方法の予防的有効性を実証するために、チンチラモデルを考え、実際に既に使用している。このモデルはまた、抗DNABII抗体の受動送達を介する、またはIHFまたは他のDNABIIファミリーメンバーに結合することが知られている小分子もしくは他の薬剤の送達を介する、治療的手法に有用である。

【0138】

実施例4

いくつかの口内細菌（例えば、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Porphyromonas gingivalis*）は、歯槽骨および歯肉を破壊する、歯周病およびインプラント周囲炎などの炎症性疾患の病原に関係している。これらの細菌の病原性の調査は、有効な動物モデルがないことによって阻まれてきた。特定の細菌の病原性を調査することの課題の一つは、外来性細菌が動物の口腔内に導入される場合にバイオフィルムを定着させる難しさである。歯周病の動物モデルは開発されているが、培養可能な細菌は、植え付けた動物の口腔から、めったに回収されない。特定の細菌の病原性を判定することができる有効な動物モデルを開発することは、それらの細菌の発病機構を解明する大いなる助けとなるであろう。

【0139】

機械加工されたチタン製歯科用インプラントの表面（1.2×4.5mm）は、AL03（100μm）を用いるグリットブラストとHClエッチング（pH7.8～8.0で20分間）によって改変することができる。機械加工されかつ表面微細処理したインプラントを、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*（Aa）のD7S臨床株を植え付けたTSB培地中で、37℃で1～3日間インキュベートすることができる。このインプラント上の細菌性バイオフィルムを、LIVE/DEAD（登録商標）BacLight（商標）での染色後に、SEMによって、また共焦点レーザー走査型顕微鏡によって、分析することができる。Aaバイオフィルムが定着したおよび定着していないインプラントを、雌ラットの歯槽骨に、上顎の小白歯部分と切歯部分の間に経粘膜的に埋め込む。*in vivo*で埋め込まれたインプラント上のAaバイオフィルムの存在を検出するために、2日後に、唾液、およびインプラントの口腔面から細菌サンプルを収集する。Aaは、培養によって、またPCR分析によって検出した。

【0140】

実施例5

この実験は、ライム病を処置するための妨害剤の前臨床試験のためのマウスモデルを提供する。Dresserら、Pathogens 5(12)e1000680, Epub 2009 Dec. 4を参照のこと。ライム病は、米国では最も一般的なダニ媒介疾患である。1992年から2006年までに、報告症例は2倍以上になっており、2008年には約29,000の新しい患者が確認されている。推定では、ライム病の患者の実数は、流行地域では、報告されている数を6~12倍上回る可能性がある。当然のことながら、人々は都市から郊外に移動し続け、オジロジカ(マダニ(tick species Ixodes))を運ぶ)も次第にこれらの地域をうろつくようになるので、これらの流行地域は拡大している。ライム病は、微生物Borrelia burgdorferi、スピロヘータによって引き起こされる。B. burgdorferiは、マダニが噛むことを介して伝染し、その後、血流を通じて他の組織および器官に伝播する。

10

【0141】

この動物モデルでは、C3H/HeNマウスに、背側の皮下に、および腹腔内注射で、または静脈内注射で、スピロヘータを注射する。微生物負荷の評価および組織および器官における病状の判定のために、感染の約7日後に、血液および生検材料を回収する。本発明の方法および組成物は、生じるB. burgdorferiバイオフィーム(これは、接種の後に形成され、疾患の病因と慢性的状態との両方に寄与すると考えられている)の減少および/または除去のための治療戦略と予防戦略の両方を進展させることが期待されている。

【0142】

20

実施例6

この実験は、嚢胞性線維症を処置するための薬剤の前臨床試験のためのブタモデルを提供する。Stoltzら(2010)Science Translational Medicine 2(29):29ra31を参照のこと。嚢胞性線維症は、CF膜コンダクタンス制御因子(CFTRと呼ばれる)アニオンチャンネルをコードする遺伝子の突然変異が原因の常染色体劣性遺伝疾患である。このモデルでは、ブタは、「CFTR」と呼ばれる遺伝子の欠損を保有するように特別に育種されており、またCFブタと呼ばれ、複数の細菌種による下気道の感染を含めたCF肺疾患という顕著な特徴を自然発生的に示す。このブタは、1)こうしたCFブタをポリペプチドまたは他の免疫原で免疫化し、それによって、肺における細菌性バイオフィームを根絶することとなる抗体の形成を誘発するために、こうした動物の肺に噴霧によって抗IHF(または他の妨害剤)を送達して、疾患の徴候および随伴する病状の改善を判定するために、妨害剤で免疫化することができる。

30

【0143】

実施例7

本出願人等はまた、結核(TB)のための前臨床モデルも提供する。Ordwayら(2010)Anti-Agents and Chemotherapy 54:1820を参照のこと。微生物Mycobacterium tuberculosisは世界的な感染症の増大の原因である。現在の数字によれば、約800万人のTBの新規の患者が存在し、TBが原因で年間約270万人が死亡することが示されている。HIVに感染している個人の同時感染としてのこの微生物の役割に加えて(HIVに感染している約4500万人のうち、約1/3はM. tuberculosisにも同時感染していると推定される)、分離菌が非常に多剤耐性となりつつあり、TBのための新規の薬物が四半世紀にわたって導入されていないことが特に厄介である。この動物モデルでは、SPFモルモットが、障壁コロニー内に維持され、エアロゾル化した噴霧剤を介して感染させて、約20cfuのM. tuberculosis株Erdman K01 bacilliを肺に送達する。接種後25、50、75、100、125、および150日目の細菌負荷の決定および病理組織学的判定のための組織の回収と共に、動物を屠殺する。TBの典型的な徴候を示さないマウスとは異なり、このようにして接種したモルモットは、中心が壊死した十分に器質化された肉芽腫、すなわちヒト疾患の顕著な特徴を示す。さらに、ヒト

40

50

と同様に、モルモットは、原発巣複合体の一部としての流入領域リンパ節の重い化膿性肉芽腫性および壊死性リンパ節炎を示す。このモデルの使用によって、生じる *M. tuberculosis* バイオフィーム（これは、接種後のこうした動物の肺に形成されることが認められており、疾患の病因と慢性化との両方に寄与すると考えられている）の減少および/または除去のための治療戦略と予防戦略を確認および特定するための前臨床スクリーニングが提供されることとなる。

【0144】

実施例 8

カテーテル/留置器具バイオフィーム感染の複数の動物モデルが知られている。Otto (2009) *Nature Reviews Microbiology*, 7:555 を参照のこと。微生物 *Staphylococcus epidermidis* は、通常は正常な皮膚の細菌叢と考えられるが、多くの人が重要な日和見病原体とみなすものとなりつつあり、院内感染の原因菌の第一位である。第一に、この細菌は、器具挿入中に、通常のこの皮膚生着菌によって汚染された留置医療器具上で発生する大多数の感染の原因である。一般的には生命を脅かすものではないが、こうしたバイオフィーム感染の処置に伴う困難は、処置の頻度と相まって、深刻な公的健康保険の負担となる。*S. epidermidis* が原因である、血管カテーテルに伴われる血流感染単独の処置に伴う現在の費用は、米国では年間 20 億ドルに達する。*S. epidermidis* の他に、*E. faecalis* および *S. aureus* も、留置医療器具上に見られるコンタミネーションである。ウサギ、マウス、モルモット、およびラットを含めた、カテーテルに伴われる *S. epidermidis* 感染の数種の動物モデルが存在し、これらはすべて、病因の分子機構を研究するために使用され、かつ、予防法および/または治療法の研究に適している。*E. faecalis*、*S. aureus*、および *S. epidermidis* バイオフィーム形成を妨害する治療法を評価するために、ラット頸静脈カテーテルが使用されている。バイオフィーム減少は、多くの場合、3通りの方式で測定される - (i) カテーテルを超音波処理して CFU を算出する、(ii) カテーテルを薄切りにするもしくは単純にプレート上に置いて点数化する、または (iii) バイオフィームをクリスタルパイオレットまたは別の色素で染色し、溶出し、CFU に代わるものとして OD 測定することができる。

【0145】

実施例 9

本明細書に記述する方法は、ヒトおよび動物における免疫応答を引き起こすために使用することができる。免疫原性組成物は、限定はされないがアルミニウム塩およびリポソームなどのアジュバントの存在下で、ヒトおよび動物被験体に投与することができる。当業者であれば、任意の数の薬学的に受容可能なアジュバントも使用することができることを理解するであろう。免疫原性組成物は、筋肉内に、皮下に、鼻腔内に、または任意他の適切な経路を介して、ヒトまたは動物被験体に投与することができる。免疫原性組成物は、選択された投与様式に一致した方式で調製することができる。免疫原性組成物は、ポリペプチド、核酸、またはこれらの組み合わせの形をとることもできるし、全長または部分抗原を含むこともできる。さらに、またはあるいは、免疫原性組成物は、ある特定の抗原でパルスした APC、またはある特定の抗原をコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチドで形質移入した APC の形をとることができる。投与は、免疫原性組成物の単回投与、または初回投与とそれに続く 1 回または複数回の追加免疫投与を含むことができる。追加免疫投与は、初回投与の、1 日、2 日、3 日、1 週間、2 週間、3 週間、1 か月、2 か月、3 か月、6 か月、もしくは 12 か月後、または他の任意の時点で提供することができる。追加免疫投与は、被験体の抗体力価の評価後に投与することができる。

【0146】

実施例 10

本明細書に記述する方法は、免疫のない被験体に受動免疫を与えるために使用することができる。ある抗原に対する受動免疫は、ある特定の抗原を特異的に認識するまたはある

特定の抗原と特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントの移入を介して与えることができる。抗体の供与者および受容者は、ヒトまたはヒトでない被験体であり得る。さらに、またはあるいは、抗体組成物は、ある特定の抗原を特異的に認識するまたはある特定の抗原と特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントをコードする単離されたまたは組み換え型のポリヌクレオチドを含むことができる。

【0147】

受動免疫は、免疫原性組成物の投与が受容被験体にリスクを与える、または受容被験体が免疫不全である、またはレシピエント被験体が速やかな免疫を必要とする場合に与えることができる。免疫原性組成物は、選択された投与様式に一致した方式で調製することができる。組成物は、全抗体、抗原結合フラグメント、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、*in vivo*で産生された抗体、*in vitro*で産生された抗体、精製されたまたは部分的に精製された抗体、または全血清を含むことができる。投与は、抗体組成物の単回投与、または初回投与とそれに続く1回または複数回の追加免疫投与を含むことができる。追加免疫投与は、初回投与の、1日、2日、3日、1週間、2週間、3週間、1か月、2か月、3か月、6か月、もしくは12か月後、または他の任意の時点で提供することができる。追加免疫投与は、被験体の抗体力価の評価後に投与することができる。

10

【0148】

本発明を、上の実施形態と共に説明してきたが、前述の説明および実施例は、例示が目的であり、本発明の範囲を限定しないことを理解するべきである。本発明の範囲内の他の実施態様、利点、および改変も、本発明に係る当業者には明らかであろう。

20

【0149】

別段の定義のない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって共通に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書で提供されるすべてのヌクレオチド配列は、5'から3'方向で表される。

【0150】

本明細書で例示的に説明する本発明は、本明細書に具体的に開示していないいかなる要素(1つまたは複数)、制約(1つまたは複数)も存在しない場合に、適切に実施することができる。したがって、例えば、用語「含むこと」「含まれること」、「含有すること」などは、広くかつ制限なく解釈されるべきである。さらに、本明細書で用いられる用語および表現は、限定の用語ではなく、説明の用語として使用されており、提示および説明される特徴のあらゆる等価物またはその部分を排除するこうした用語および表現の使用は意図されず、しかし主張する本発明の範囲内で、様々な改変が可能であることが認識されよう。

30

【0151】

したがって、本発明を、好ましい実施形態および任意選択の特徴によって具体的に開示してきたが、その中に例示した本明細書に開示する本発明の改変、改良、および変形を、当業者によって行使することができること、また、こうした改変、改良、および変形が、本発明の範囲内であるとみなされることを理解するべきである。ここで提供する材料、方法、および実施例は、好ましい実施形態を代表するものであり、例示的であり、本発明の範囲を限定するものとは意図されない。

40

【0152】

本発明を、本明細書で広くかつ包括的に説明してきた。包括的開示内に含まれるより狭い種および包括的亜集合の各々も、本発明の一部をなす。これには、削除された材料が本明細書に具体的に列挙されたか否かにかかわらず、属からあらゆる被験体物を除外する条件または否定的制限を伴う、本発明の包括的説明が含まれる。

【0153】

さらに、本発明の特徴または実施態様が、マーカッシュ群で記述される場合、当業者は、それによって本発明も、マーカッシュ群のあらゆる個々のメンバーまたはメンバーの部分群で記述されることを認識するであろう。

50

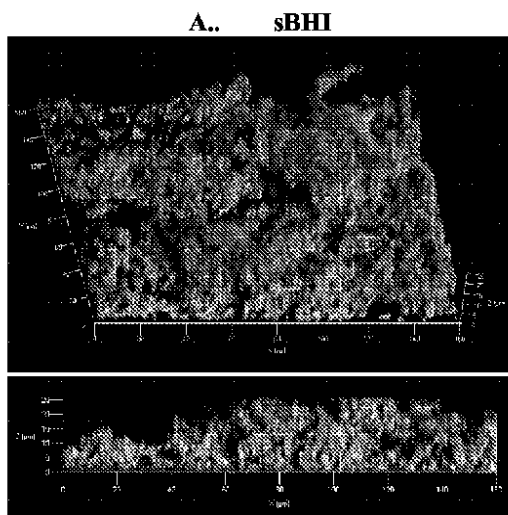
【 0 1 5 4 】

本明細書で挙げたすべての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献の内容全体を、まるで、それぞれが個々に参照によって組み込まれているのと同じ位に、参照によってはっきりと組み込む。紛争の場合には、本明細書は、定義を含めて、調整を行うつもりである。

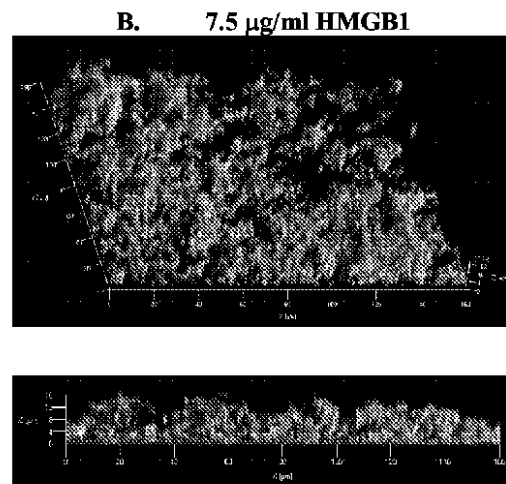
【 0 1 5 5 】

本発明を、上の実施形態と共に説明してきたが、前述の説明および実施例は、例示が目的であり、本発明の範囲を限定しないことを理解するべきである。本発明の範囲内の他の実施態様、利点、および改変も、本発明に関係する当業者には明らかであろう。

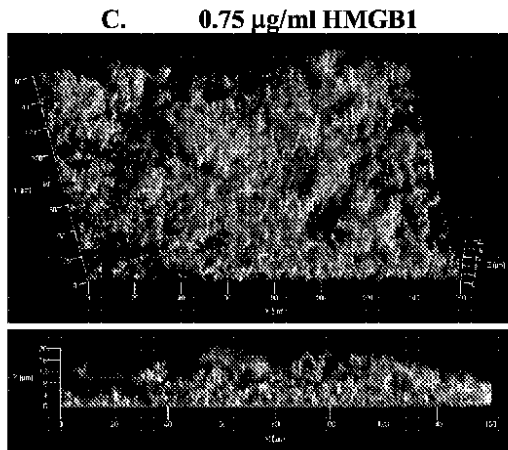
【 図 5 A 】



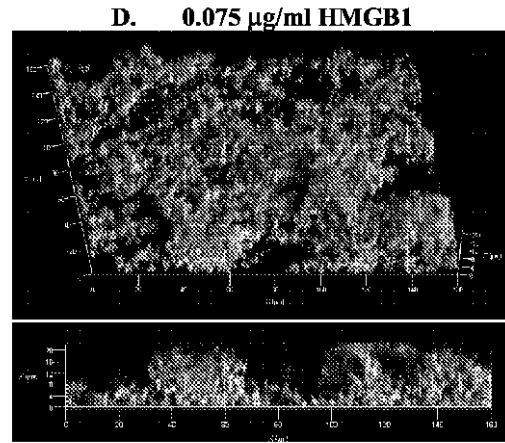
【 図 5 B 】



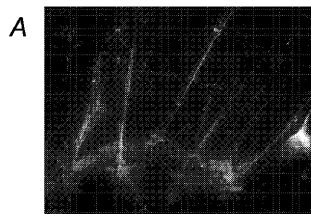
【 図 5 C 】



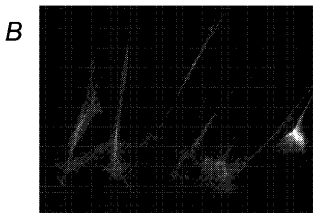
【 図 5 D 】



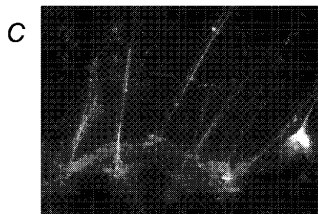
【 図 6 A 】



【 図 6 B 】



【 図 6 C 】



【 図 7 】

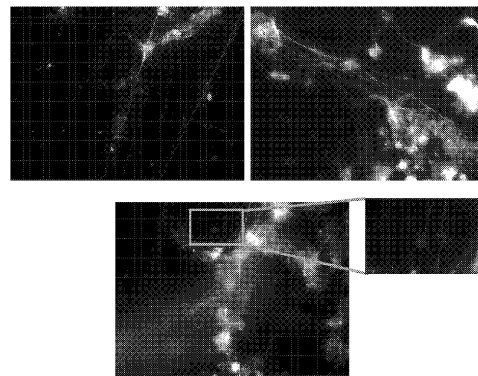


FIG. 7

【 図 8 】

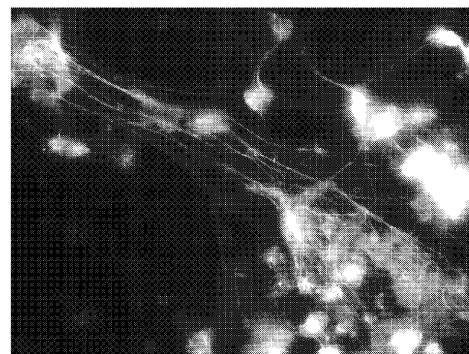


FIG. 8

【 図 9 】

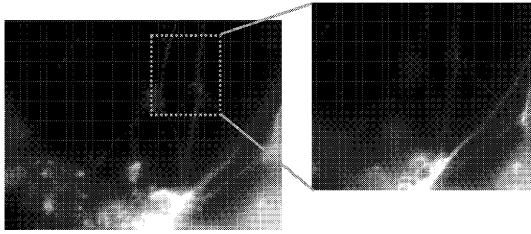


FIG. 9

【 図 1 】

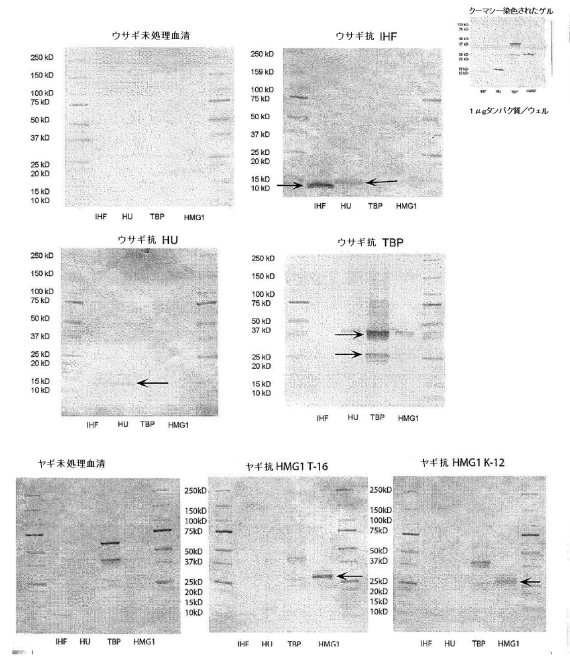


FIG. 1

【 図 2 】

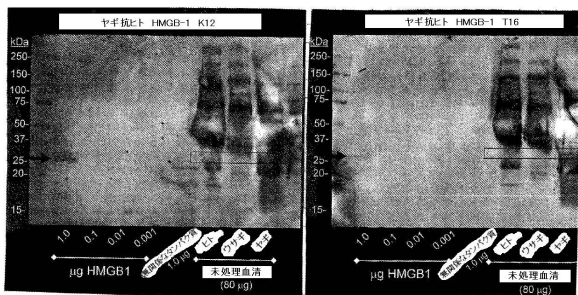


FIG. 2

【 図 4 】

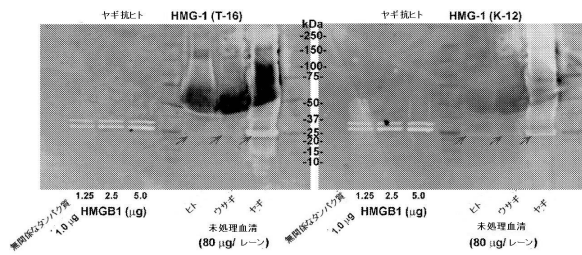


FIG. 4

【 図 3 】

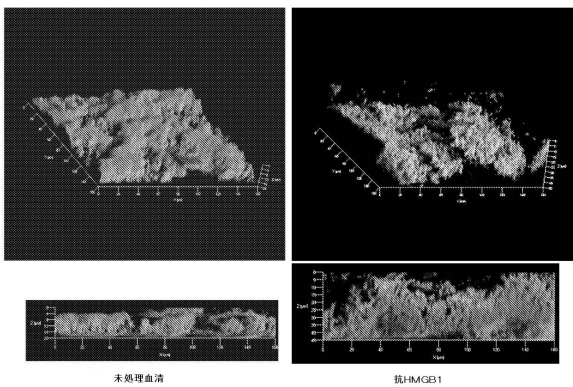
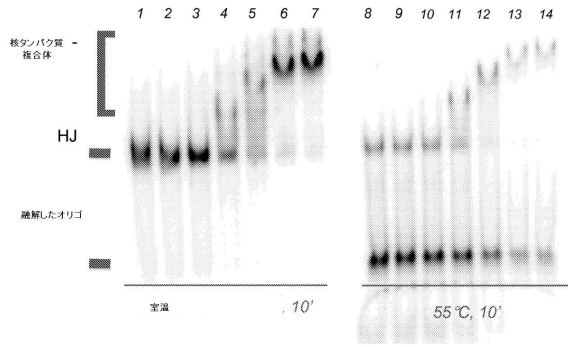


FIG. 3

【 図 10 】



ゲルシフト条件において、各反応物は、25nM ³²P-HJを含有していた

- 1 & 8. ³²P-HJ のみ
- 2 & 9. 25 nM HMGB1 を含む
- 3 & 10. 50 nM HMGB1 を含む
- 4 & 11. 100 nM HMGB1 を含む
- 5 & 12. 200 nM HMGB1 を含む
- 6 & 13. 400 nM HMGB1 を含む
- 7 & 14. 500 nM HMGB1 を含む

FIG. 10

フロントページの続き

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 グッドマン, スティーブン ディー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 90089-2561, ロサンゼルス, マクリントック
アベニュー 3740, イーイービー 131, ユニバーシティー オブ サザン カリフォル
ニア 気付

(72)発明者 バカレッツ, ローレン オー.

アメリカ合衆国 オハイオ 43205, コロンバス, チルドレンズ ドライブ 700,
ダブリュー591, ザ リサーチ インスティテュート アット ネイションワイド チルドレ
ンズ ホスピタル, センター フォー マイクロバイアル パソジェネシス 気付

審査官 井上 明子

(56)参考文献 特表2005-519998(JP,A)

特表2006-506441(JP,A)

特表2013-529893(JP,A)

国際公開第2006/114805(WO,A1)

Pharmaceuticals, 2010年, Vol.3, p.1374-1393

Current Opinion in Structural Biology, 2004年, Vol.14, p.28-35

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009年, Vol.53, No.3, p.1204-1209

生化学, 1996年, 第68巻, 第12号, 第1829-1834

J. Mol. Biol., 2008年, Vol.381, p.238-247

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00 - 38/58

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)